

Sara Cristina Lobo Alves

Expressão de *CD1D* na doença autoimune pênfigo foliáceo: quantificação e variantes de RNAm

Curitiba

2013

Sara Cristina Lobo Alves

Expressão de CD1D na doença autoimune pênfigo foliáceo: quantificação e variantes de RNAm

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná, sob orientação da Profa. Dra. Maria Luiza Petzl-Erlar.

Curitiba

2013



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **SARA CRISTINA LOBO ALVES**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito "B".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 25 de setembro de 2013

Doutora Karin Braun-Prado
Dep. Patologia Básica/UFPR – Membro Titular

Doutora Lupe Furtado Alle
Dep. Genética/UFPR – Membro Titular

Doutora Maria Luiza Petzl-Erler
Dep. Genética/UFPR – Orientadora e Presidente da Banca

Visto

Prof^º Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza
Coordenador do PPG - GEN - UFPR
Matricula 176702

Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Prof^a Maria Luiza pela oportunidade concedida, pelos ensinamentos, pela assistência e pela compreensão.

A minha família, que é o que há de mais importante na minha vida, em especial a meus pais, Luis e Romilda, agradeço pelo apoio para que eu pudesse sempre prosseguir em busca de meus objetivos.

Aos meus amigos do Laboratório de Genética Molecular Humana pela IMENSURÁVEL ajuda: seja aplicando um gel, ajudando a encontrar uma informação, ensinando a “mexer” em um programa, desenhando uma figura, explicando um protocolo, opinando sobre um problema, revisando o trabalho, ajudando na formatação do texto da dissertação, anotando dados de D.O., trazendo um docinho para alegrar o dia. De uma ou outra forma vocês foram essenciais! Muito Obrigada!

RESUMO

O pênfigo foliáceo (PF) é uma doença autoimune da pele na qual há a formação de autoanticorpos contra a desmogleína 1, proteína importante na adesão entre queratinócitos. O PF se caracteriza pelo desprendimento da camada superior do epitélio, com formação de bolhas e erosões na pele. Como a maioria das doenças autoimunes, o pênfigo é uma doença complexa na qual atuam fatores ambientais e genéticos. O gene *CD1D* codifica a glicoproteína CD1d que participa da apresentação de antígenos glicolipídicos para células T natural killer (NKT). Além da importante função nas respostas imunes, o gene *CD1D* já foi reportado superexpresso em células TCD4+ de pacientes de pênfigo. O objetivo do presente trabalho foi comparar a expressão de *CD1D* e o padrão de expressão das suas variantes de RNAm em monócitos e linfócitos B IgG+ e IgG-, entre pacientes de pênfigo foliáceo e controles. Nossos resultados demonstraram que em monócitos *CD1D* está subexpresso em pacientes com lesão ($P = 0,0079$, diferença de expressão – DE = 0,44) e sem lesão ($P = 0,0028$, DE = 0,30) em relação aos indivíduos controle. Além disso, neste tipo celular o RNAm representado pela banda 1C (que possui os éxons 3 e 4 completos) é menos frequente em pacientes que em controles ($P = 0,011$). Em linfócitos B não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na expressão de *CD1D* entre pacientes e controles (células B IgG+ DE = 1,84 $P = 0,18$ / células B IgG- DE = 5,28 $P = 0,15$). Por meio desses resultados concluímos que a expressão de *CD1D* está alterada em pênfigo foliáceo, o que nos leva a sugerir que haja participação de células NKT e antígenos glicolipídicos na patogênese do pênfigo. O papel de *CD1D* e sua expressão em nível de RNA e proteína pode ser foco de estudos futuros tanto em pênfigo quanto em outras doenças autoimunes.

Palavras chave: pênfigo foliáceo, expressão gênica, *CD1D*, variantes de RNAm, células NKT.

ABSTRACT

Pemphigus foliaceus is an epidermal autoimmune disease characterized by pathogenic autoantibodies against desmoglein 1, an important cell-cell adhesion protein. It is a blistering disease characterized by erosive lesions in the upper epidermal layers of the skin. Pemphigus foliaceus pathogenesis is not completely understood, yet, genetic and environmental factors generate and modulate the autoimmune response. The *CD1D* gene encodes an MHC class I like glycoprotein (CD1d) whose main function is presenting glycolipid antigens to natural killer T (NKT) cells. The *CD1D* mRNA was recently reported as overexpressed in T CD4⁺ cells of pemphigus patients when compared with healthy individuals. The aim of this work was compare the *CD1D* mRNA expression and the mRNA variants expression pattern in monocytes, IgG⁺ and IgG⁻ B lymphocytes between patients and controls. We found that in monocytes *CD1D* mRNA is underexpressed in patients with ($P = 0.0079$ ED = 0.44) and without lesions ($P = 0.0028$ ED = 0.30). Furthermore the mRNA represented by 1C band (with complete exons 3 and 4) was significantly less frequent in patients than in controls ($P = 0.011$). For B cells there were not found statistically significant differences in the level of mRNA of CD1d between pemphigus patients and controls (IgG⁺ B cells ED = 1.84 $P = 0.1829$ / IgG⁻ B cells ED = 5.28 $P = 0.1508$). These results led us to conclude that the expression of *CD1D* is altered in pemphigus foliaceus and point to participation of NKT cells and glycolipid antigens in pemphigus. The role of *CD1D* and its expression at the RNA and protein levels in pemphigus and other autoimmune diseases should be focused in future studies.

Key-words: pemphigus foliaceus, *CD1D*, gene expression, mRNA variants, NKT cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Pacientes de Pênfigo foliáceo (A) forma generalizada, (B) forma localizada. (C) Lesões no tronco, a seta indica uma bolha intacta preenchida por fluido inflamatório. (D) Lesão escamosa na face.	12
Figura 2: Aspecto histológico da epiderme. A epiderme normal. B epiderme com bolhas intraepidérmicas em pênfigo foliáceo.	14
Figura 3: Modelo da via imunopatogênica do PFE: Inicialmente, fatores ambientais desencadeiam a produção de anticorpos IgG1 e IgG 4 não-patogênicos contra o domínio EC5 da Dsg1.	15
Figura 4: Representação da molécula CD1d presente na membrana de células apresentadoras de antígenos (APCs), apresentando antígeno lipídico para as células NKT. Fonte: KER,.....	19
Figura 5: A. Representação da grande diversidade de citocinas e quimiocinas que as células NKT podem liberar de maneira rápida. B.Exemplo da ampla gama de células que podem ser influenciadas pelas células NKT.....	20
Figura 6: Representação do RNAm completo de <i>CD1D</i> . Composto por 7 éxons, cujos limites são representados pelas linhas verticais vermelhas e os tamanhos em pares de nucleotídeos indicados abaixo de cada éxon. A região traduzida encontra-se em laranja. S: peptídeo sinal. $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$: domínios da molécula, TM: região transmembrânica, T: domínio citoplasmático.	20
Figura 7: Representação esquemática das variantes derivadas da recomposição alternativa de CD1D. Os números ao lado de cada variante indicam em quais trabalhos foram detectadas	22

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1	Pênfigo Foliáceo.....	11
2.1.1	Classificação e formas clínicas	11
2.1.2	Epidemiologia.....	12
2.1.3	Aspectos histopatológicos e imunológicos	13
2.1.4	Etiologia.....	15
2.1.5	Tratamento	17
2.2	Família gênica CD1.....	17
2.2.1	Estrutura e função	17
2.3	MOLÉCULA CD1d E CÉLULAS NKT	18
2.4	Gene <i>CD1D</i>	20
2.4.1	Estrutura e Polimorfismo	20
2.4.2	Recomposição alternativa de <i>CD1D</i>	21
2.4.3	Expressão de <i>CD1D</i> em doenças	22
2.5	Expressão de <i>CD1D</i> em pênfigo foliáceo	23
3	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	25
4	ARTIGO	26
5	DISCUSSÃO	46
6	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
	KINJO Y., KITANO N., KRONENBERG M. The role of invariant natural killer T cells in microbial immunity. Journal of Infection and Chemotherapy, v.19, p.560-570, 2013.	54
	APÊNDICE.....	60
	ANEXO I	70

ANEXO II.....	73
---------------	----

1 INTRODUÇÃO

O pênfigo foliáceo (PF) é uma doença autoimune, na qual há a formação de autoanticorpos contra a desmogleína 1, uma glicoproteína constituinte dos desmossomos da epiderme. A doença é endêmica em certas regiões do Brasil, país onde atinge sua maior incidência. Sua etiologia ainda não está bem elucidada, sabe-se, no entanto, que é uma doença complexa na qual atuam fatores genéticos em conjunto com ambientais. Assim como na maioria das doenças autoimunes o desenvolvimento do pênfigo foliáceo depende de vários genes que tem efeito baixo ou moderado sobre o fenótipo dos indivíduos, sem que nenhum alelo seja suficiente ou necessário para que a doença ocorra.

Ao longo dos últimos 25 anos nosso grupo de pesquisa realiza estudos com o objetivo de desvendar o componente genético implicado na patogênese desta doença. Para dar prosseguimento aos estudos é necessário avaliar os resultados já obtidos e elaborar novas hipóteses. Em um estudo anterior de nosso grupo a expressão gênica global de linfócitos T CD4⁺ foi comparada entre subgrupos de pacientes de pênfigo foliáceo e vulgar e indivíduos controle (MALHEIROS, 2009). Foram detectados vários genes diferencialmente expressos, cujos produtos possuem funções em diversos processos celulares. Entre os com maior diferença de expressão estava o gene *CD1D*, que codifica uma glicoproteína (CD1d) estruturalmente semelhante às moléculas MHC de classe I. A molécula CD1d apresenta antígenos glicolipídicos às células NKT (*natural killer T cells*), que realizam funções imunoreguladoras. Foi diante deste contexto que o presente trabalho foi planejado a fim de investigar aspectos do gene *CD1D* no contexto da doença PF endêmico (PFE).

Neste trabalho temos dois enfoques principais, a análise quantitativa de RNAm de *CD1D* em indivíduos saudáveis e em pacientes de pênfigo foliáceo e a análise qualitativa e semi quantitativa da expressão de suas variantes de RNAm. A recomposição alternativa dos RNAs transcritos de *CD1D* ainda não é muito bem estudada e o padrão de expressão de seus RNAm variantes foi reportado em poucos estudos e para um número limitado de tipos celulares. Descreveremos neste trabalho quais variantes estão presentes em diferentes tipos celulares do sangue venoso periférico (monócitos, B IgG⁺ e B IgG⁻). Buscamos, dessa forma, detectar uma possível expressão diferencial das variantes entre pacientes de PFE e indivíduos controles.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pênfigo Foliáceo

2.1.1 Classificação e formas clínicas

Pênfigo é a denominação dada a um conjunto de doenças autoimunes, específicas da epiderme, caracterizadas pela produção de autoanticorpos direcionados contra as desmogleínas, proteínas de adesão celular expressas nos desmossomos dos queratinócitos (JONES *et al.*, 1984). Os autoanticorpos reconhecem as desmogleínas e com isso há a formação de bolhas intraepiteliais, resultantes da perda da adesão entre as células, processo que é chamado de acantólise (DIAZ *et al.*, 1989).

Há vários subtipos de pênfigo, sendo que o pênfigo foliáceo (PF) e o pênfigo vulgar (PV) são os principais. Em ambas as formas há a formação de autoanticorpos contra a desmogleína, o que difere entre elas é qual desmogleína é alvo dos autoanticorpos. No pênfigo vulgar os autoanticorpos são principalmente contra a proteína desmogleína 3, presente na camada suprabasal inferior da epiderme e nas mucosas, com isso as lesões do PV se caracterizam por serem mais profundas. Já no pênfigo foliáceo, a desmogleína 1, proteína restrita a camada superior do epitélio, é o principal alvo dos autoanticorpos, sendo que as lesões no PF ocorrem apenas na camada superficial da epiderme (UDEY e STANLEY, 1999). Além das desmogleínas outros autoantígenos já foram descritos tanto para PV quanto para PF. Entre eles estão: placoglobinas (KORMAN *et al.* 1989), desmocollinas I e II (DMOCHOWSKI *et al.* 1993), receptores colinérgicos (NGUYEN *et al.*, 1998) e desmoplaquinas (KIM *et al.*, 2001).

Clinicamente, o pênfigo foliáceo se manifesta de duas formas: a forma localizada e a forma generalizada (Figura 1) (HANS-FILHO *et al.*, 1999; CAMPBELL *et al.*, 2001). Na forma localizada, as lesões (pequenas bolhas que rapidamente se rompem) se limitam na maioria das vezes a áreas seborreicas da pele (face, pescoço e partes superiores do tronco). A maioria dos pacientes com a forma localizada permanece com as lesões confinadas a essas áreas, porém alguns podem apresentar disseminação das lesões para o tronco, abdômen e membros superiores e inferiores, evoluindo para a forma generalizada do pênfigo foliáceo. Na forma generalizada pode haver três fases clínicas distintas, uma fase aguda que se caracteriza por lesões bolhosas por todo o corpo, na qual há uma grande possibilidade de haver infecções secundárias. Uma segunda fase é caracterizada por um eritoderma esfoliativo com erosões crostosas e exsudato inflamatório, sendo esta a fase de expressão

máxima da forma generalizada do PF, na qual os pacientes geralmente necessitam de doses mais altas de corticosteroides para haver controle da doença. A terceira fase, hiperpigmentada, está associada à remissão da doença e cicatrização de lesões, porém a hiperpigmentação também pode atingir áreas que não estavam afetadas (CAMPBELL *et al.*, 2001).



Figura 1: Pacientes de Pênfigo foliáceo (A) forma generalizada, (B) forma localizada. (C) Lesões no tronco, a seta indica uma bolha intacta preenchida por fluido inflamatório. (D) Lesão escamosa na face.

Fonte: Figuras 1 (A) e 1 (B) Arquivo Laboratório de Genética Molecular Humana. Figuras 1 (C) 1 (D) JAMES *et al.*, 2011.

2.1.2 Epidemiologia

O pênfigo foliáceo pode ser encontrado sob duas formas: o não-endêmico e o endêmico. O não-endêmico ocorre esporadicamente em todo o mundo, e o endêmico ocorre apenas em certas áreas geográficas e possui registros no Brasil, na Colômbia, no Paraguai, no Peru entre outros países da América do Sul e também na Tunísia (HANS-FILHO *et al.*, 1999, JAMES *et al.*, 2011.). Não há diferenças clínicas nem histopatológicas entre as formas esporádica e endêmica, sendo as duas formas diferenciáveis apenas epidemiologicamente. As

formas endêmicas também diferem entre si quanto à epidemiologia, na Tunísia a incidência de pênfigo é de 6,7 casos por milhão de habitantes por ano, com uma proporção de mulheres para homens afetados de 4:1 (BASTUJI-GARIN *et al.*, 1995). Em contrapartida, na Colômbia, os principais afetados são homens por volta dos 40 anos envolvidos com a atividade mineradora (ROBLEDO *et al.*, 1988).

No Brasil o pênfigo foliáceo endêmico (PFE), também conhecido como fogo selvagem, atinge sua maior incidência, 25-35 casos por milhão por ano. Os estados de Mato Grosso do Sul, Goiás, Paraná, São Paulo e Minas Gerais possuem maior número de pacientes (DIAZ *et al.*, 1989). Prevalências muito elevadas do PFE foram observadas em algumas populações indígenas brasileiras, como por exemplo, a tribo Terena que habita a reserva de Limão Verde no Mato Grosso do Sul e possui 3,4% de prevalência (WARREN *et al.*, 2000). Já na tribo indígena Xavante a prevalência é de 1,4% (FRIEDMAN *et al.* 1995).

O PFE afeta predominantemente pessoas que vivem ou viveram em áreas rurais, principalmente na proximidade de rios e córregos e frequentemente acomete crianças e jovens, sendo o pico de incidência entre a segunda e a terceira décadas de vida. A razão de mulheres e homens afetados é de 1:1 (DIAZ *et al.*, 1989). O número de novos casos da doença aumenta entre os meses de setembro e março, ou seja, na estação quente e chuvosa do ano. O PFE ocorre em regiões com altitude entre 500 a 800 metros, sendo rara nas regiões abaixo de 400 metros e acima de 1000 metros (LOMBARDI *et al.*, 1992).

2.1.3 Aspectos histopatológicos e imunológicos

A mais marcante característica histológica do pênfigo foliáceo é a presença de acantólise nas bolhas intraepidérmicas (CAMPBELL *et al.*, 2001), as quais ocorrem devido à perda de adesão entre os queratinócitos.

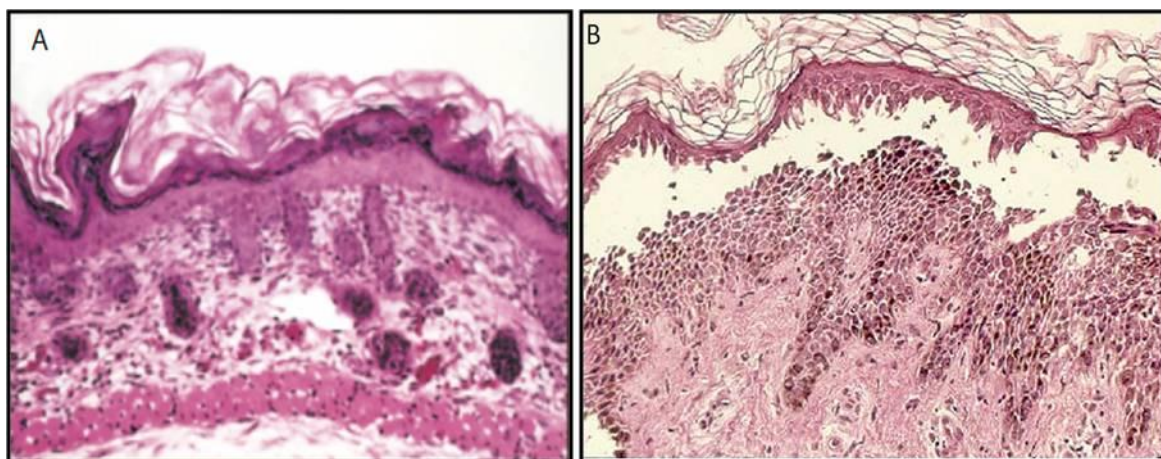


Figura 2: Aspecto histológico da epiderme. **A** epiderme normal. **B** epiderme com bolhas intraepidérmicas em pênfigo foliáceo.

Fonte: A: WU *et al.*, 2000. B: HALE *et al.*, 2002

A desmogleína 1 (DG1), caracterizada como principal antígeno do PF, é uma glicoproteína transmembrânica, integrante dos desmossomos e que tem uma participação importante na adesão celular da epiderme (WHEELER *et al.*, 1991). Quando reconhecida pelos autoanticorpos, a DG1 perde a capacidade de adesão e com isso formam-se as lesões características da doença. A detecção de autoanticorpos circulantes no soro é realizada principalmente por imunofluorescência indireta, e por imunofluorescência direta detecta-se os autoanticorpos depositados sobre a membrana dos queratinócitos da pele lesionada de pacientes (CAMPBELL *et al.*, 2001). Os anticorpos circulantes são principalmente IgG, das subclasses IgG1 e IgG4, sendo que o IgG4 é o tipo predominante entre os anticorpos depositados sobre os queratinócitos. Foi observado também que o estado de remissão da doença depende do decréscimo dos títulos de IgG4 (MARTEL e JOLY, 2001). Em 2003 Li *et al.*, sugeriram que um modelo para explicar a via imunopatogênica do PFE (Figura 3). Segundo essa hipótese os autoanticorpos anti DG1 em PFE são inicialmente formados contra o domínio EC5 da proteína DG1, em indivíduos saudáveis da região endêmica, dentre esses, aqueles que forem geneticamente susceptíveis desenvolvem anticorpos contra outros epítomos da proteína (EC1 e EC2) desencadeando o processo patológico do PFE.

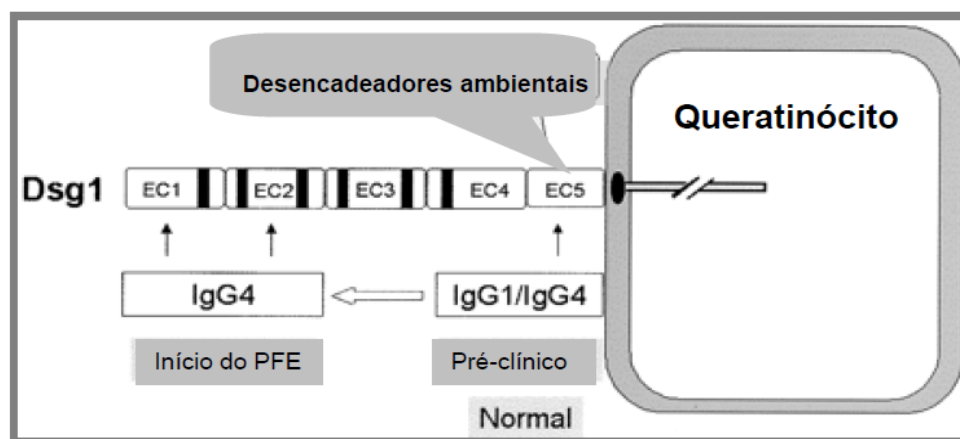


Figura 3: Modelo da via imunopatogênica do PFE: Inicialmente, fatores ambientais desencadeiam a produção de anticorpos IgG1 e IgG 4 não-patogênicos contra o domínio EC5 da Dsg1. Em indivíduos geneticamente predispostos, o espalhamento intramolecular de epítomos resulta na geração de anticorpos IgG4 contra os domínios EC1 e EC2, levando ao desenvolvimento do PFE.

Sendo o PF uma doença mediada por anticorpos é esperado que células T também participem da patogênese da doença, uma vez que a produção de anticorpos contra antígenos proteicos pelas células B geralmente requer a colaboração de células T $CD4^{+}$. Através de um estudo realizado com pacientes da tribo indígena Terena, foi demonstrado que linfócitos T de pacientes reconhecem a DG1 recombinante como autoantígeno realizando proliferação antígeno específica (LIN *et al.*, 2000). A apresentação do antígeno é feita por moléculas HLA de classe II, cujas variantes genéticas já foram encontradas associadas ao pênfigo foliáceo endêmico, salientando a importância das células T no desenvolvimento da doença (PETZLER e SANTAMARIA, 1989; PAVONI *et al.*, 2003).

2.1.4 Etiologia

2.1.4.1 Fatores ambientais

Vários fatores ambientais já foram propostos como importantes no desenvolvimento e patogênese do pênfigo foliáceo. No Brasil, a exposição a picadas de insetos hematófagos nos locais da doença é considerada um dos fatores de risco ao PFE (LOMBARDI *et al.*, 1992). Especula-se que esses insetos inoculem alguma substância salivar ou algum agente infeccioso que poderia dar início a uma resposta imunológica que reagiria de forma cruzada com a proteína desmogleína 1 (AOKI *et al.*, 2004).

Alguns estudos que relacionam insetos e PFE já obtiveram resultados interessantes. Um deles analisou a distribuição de mosquitos do gênero *Simulium* em regiões que possuem ou não focos da doença, e constatou que a distribuição da espécie *Simulium nigritanum*

coincide com as áreas endêmicas, e está em maior abundância quando comparada com as outras espécies encontradas nessas mesmas áreas (EATON *et al.*, 1998). QIAN *et al.* (2012) demonstraram que anticorpos anti-desmogleína 1 de pacientes de PFE reagem de forma cruzada com antígenos salivares do mosquito-palha (*Lutzomyia Longipalpis*), reconhecendo, mais precisamente, a proteína LJM11.

Há outros fatores ambientais considerados como sendo desencadeadores ou agravantes da doença, como o grupo tiol presente em alguns alimentos (alho, cebola, alho poró) ou na água (BRENNER E WOLF, 1994), o fenol, presente em alimentos como manga, castanha de caju, guaraná e mandioca, além de taninos, presentes na água da região endêmica, que também já foram apontados como possíveis indutores do pênfigo foliáceo (TUR e BRENNER, 1998).

2.1.4.2 Fatores genéticos

O componente genético implicado na susceptibilidade à doença evidencia-se pelo fato de que há uma agregação de casos entre indivíduos geneticamente relacionados. Ainda que se possa pensar que isso poderia ser decorrente do compartilhamento do mesmo ambiente, o que se observa é que o número de casos entre indivíduos geneticamente relacionados é superior ao de indivíduos com apenas ligações sociais, demonstrando que existe uma predisposição genética a esta doença (HANS-FILHO *et al.*, 1999). A doença, porém, não pode ser explicada por um padrão de herança mendeliana, uma vez que as taxas de recorrência são inferiores às esperadas para genes únicos de penetrância completa, sendo, desta forma, compatíveis com um padrão de herança poligênica que atua em conjunto com fatores ambientais.

A fim de identificar os múltiplos genes que podem conferir susceptibilidade ao pênfigo foliáceo endêmico, diversos estudos de associação têm sido realizados. Esses estudos geralmente baseiam-se na escolha de genes candidatos, os quais em sua maioria desempenham papéis na regulação do sistema imune. Genes que codificam, por exemplo, antígenos-alvo, moléculas apresentadoras ou processadoras de antígeno, receptores de células B e T e citocinas, assim como moléculas reguladoras da apoptose (TRON *et al.*, 2005). PETZL-ERLER e SANTAMARIA realizaram o primeiro estudo de associação com o PFE, publicado em 1989, e nele os autores detectaram uma associação positiva entre a doença e os grupos alélicos HLA-DR1 e HLA-DR4 e uma associação negativa com HLA-DR7 e HLA-DQ2. Uma análise mais detalhada sobre a associação de *HLA-DRB1* e pênfigo mostrou que os alelos que conferem susceptibilidade são *DRB1**01:01, *01:02, *01:03, *04:04 *04:06,

*04:10, *14:06 e *16:01; já a proteção à doença é conferida pelos alelos *DRB1**03:01, *07:01, *08:01 *11:01 e *11:04 (PAVONI *et al.*, 2003). Além dessas, foram observadas associações com polimorfismos de vários genes: *CD40L*, *CD40* (MALHEIROS E PETZL-ERLER, 2009) *IL4*, *IL6* (PEREIRA *et al.*, 2004) *PDCD1* (BRAUN-PRADO E PETZL-ERLER, 2007), *CD28*, *CD86*, *CTLA4* (DALLA-COSTA *et al.*, 2010) e *CHITA* (PIOVEZAN E PETZL-ERLER, 2013).

2.1.5 Tratamento

A doença é tratada principalmente com corticoides por via oral, e a prednisona é a droga mais comumente administrada aos pacientes sendo que a dose geralmente vai sendo reduzida a partir da melhora do quadro clínico. O tratamento é prolongado e efeitos colaterais podem ocorrer, os mais comuns são infecções intestinais e urinárias, hipertensão, hiperglicemia, aumento de peso, osteoporose, gastrite e úlcera gastrointestinal. As lesões que ocorrem na epiderme podem deixar o paciente susceptível a infecções bacterianas secundárias e, nestes casos, antibióticos são utilizados no tratamento. Aos pacientes também é recomendado protegerem-se do sol, uma vez que a exposição à luz ultravioleta pode induzir à formação de bolhas (CAMPBELL *et al.*, 2001).

2.2 Família gênica CD1

2.2.1 Estrutura e função

Os genes da família CD1 codificam glicoproteínas transmembrânicas estrutural e funcionalmente semelhantes às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I (PORCELLI *et al.*, 1999). Tanto as moléculas CD1 quanto as do MHC de classe I são formadas por uma cadeia pesada α , com três domínios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$), associada não covalentemente a uma cadeia leve $\beta 2$ -microglobulina. Entretanto, diferentemente das moléculas do MHC, a fenda de ligação do antígeno das CD1 é profunda e hidrofóbica, lhes permitindo apresentar antígenos lipídicos e glicolipídicos para distintas populações de células T e NKT (ZENG *et al.*, 1997).

Em humanos, os genes CD1 estão localizados no cromossomo 1q22-23 e são classificados em três grupos de acordo com a homologia de suas sequências. O grupo 1 inclui *CD1A*, *CD1B*, *CD1C*. O grupo 2 inclui somente o gene *CD1D* que não possui homologia significativa na região 5' não traduzida com os demais genes CD1, e o grupo 3 corresponde a *CD1E* (BARRAL E BRENNER, 2007).

As glicoproteínas CD1 são expressas na maioria das células apresentadoras de antígenos profissionais, como macrófagos, células dendríticas e células B, e também em timócitos. A principal função dessas moléculas é apresentar antígenos lipídicos e glicolipídicos, próprios e não-próprios, para células T, sendo esta a terceira via de apresentação de antígenos. O grupo 1 apresenta antígenos lipídicos microbianos para diversos subgrupos de células T que medeiam a imunidade adaptativa, para tanto essas células possuem um receptor de células T (TCR) altamente diverso, entre outros receptores e ligantes (de membrana e solúveis), necessários para a ativação da resposta por parte dessas células (GRANT *et al.*, 1999). Já a molécula CD1d, representante do grupo 2, apresenta antígenos lipídicos para células T *natural killer* (NKT), que expressam uma gama restrita de TCRs (BRIGL E BRENNER, 2004). Enquanto que CD1e, do grupo 3, atua no processamento de lipídios (BARRAL E BRENNER, 2007). Todas as espécies de mamíferos estudadas até o momento expressam as glicoproteínas CD1, porém sabe-se que ratos e camundongos possuem e expressam apenas o gene *CD1D* (BRIGL E BRENNER, 2004).

Apesar de possuírem pouca diversidade alélica, as moléculas CD1 conseguem apresentar uma ampla gama de antígenos, pois diferem entre si quanto à forma e volume dos sulcos de ligação, os quais podem acomodar lipídios de diferentes comprimentos e complexidades. Além disso, e principalmente, cada molécula CD1 pode apresentar diversos antígenos pelo fato da ligação entre CD1 e antígeno ocorrer por interações apolares relativamente não específicas (SCHIEFNER E WILSON, 2009).

A proteína CD1d possui uma distribuição tecidual mais ampla que as outras moléculas CD1. Em células da linhagem hematopoiética está presente e expressa em células B, células dendríticas, monócitos ativados e em células T ativadas (EXLEY *et al.*, 2000). CD1d também é encontrada em diversos órgãos (em células epiteliais, principalmente), como intestino, rins, fígado, pâncreas e útero (CANCHIS *et al.* 1993).

2.3 MOLÉCULA CD1d E CÉLULAS NKT

Células NKT são linfócitos T que desempenham um papel regulador importante nas respostas imunes a doenças infecciosas, câncer e autoimunidade (GODFREY E KRONENBERG, 2004). As NKT, como o próprio nome sugere, possuem características das células T e NK, expressam tanto o TCR (receptor de células T) como também o marcador de células NK, NKR-P1A (CD161). As células NKT são conhecidas pela capacidade de produzir citocinas rapidamente e por modularem a resposta imune. As respostas dessas células

são restritas por CD1d (Figura 4), ou seja, é necessário que haja ligação entre CD1d e seu receptor para serem selecionadas positivamente no timo e posteriormente ativadas na periferia (PARK E BENDELAC, 2000).

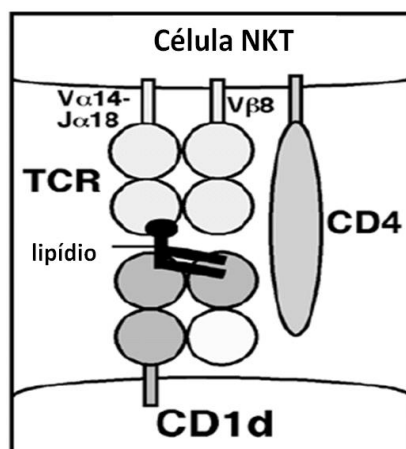


Figura 4: Representação da molécula CD1d presente na membrana de células apresentadoras de antígenos (APCs), apresentando antígeno lipídico para as células NKT. Fonte: VAN KER, 2004 (adaptado pela autora).

As células NKT cujas repostas são restritas por CD1d podem ser categorizadas em dois grupos, tipo 1 e tipo 2. As células NKT do tipo 1 são também chamadas de invariáveis (iNKT) pois expressam um TCR invariável cujo domínio de ligação é codificado por um segmento gênico *Vα14Jα18* combinado com um repertório limitado de cadeias *Vβ* (PORCELLI *et al.*, 1993). As células NKT do tipo II também atuam na regulação de respostas imunes, porém seu TCR é mais diverso e elas carecem de marcadores específicos, o que dificulta os estudos com este tipo celular (RHOST *et al.*, 2012).

A estimulação das células NKT resulta em secreção de citocinas imunoreguladoras, mais rápida que células T convencionais, que leva à ativação e/ou modulação de outras células (figura 5), direcionando para uma resposta de perfil Th1 ou Th2 dependendo do contexto do antígeno envolvido na estimulação.

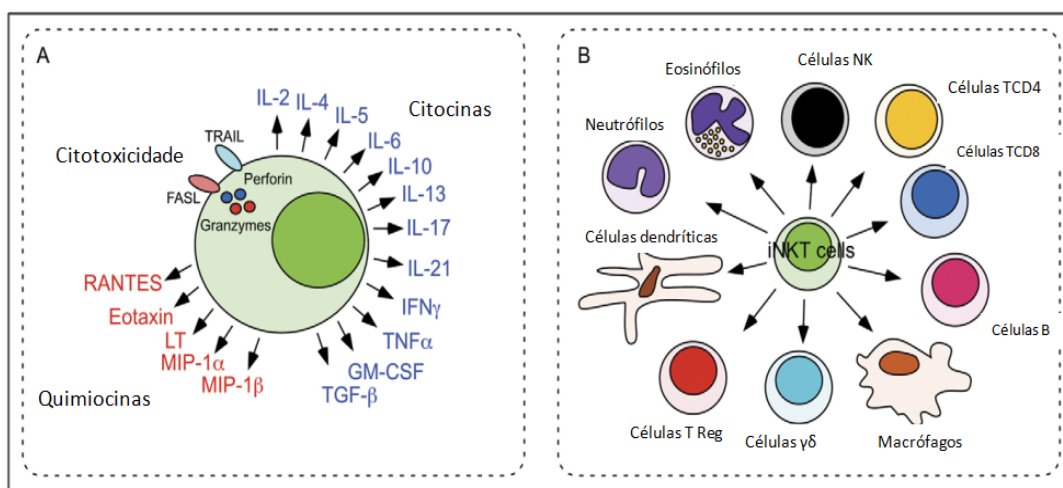


Figura 5: A. Representação da grande diversidade de citocinas e quimiocinas que as células NK podem liberar de maneira rápida. B. Exemplo da ampla gama de células que podem ser influenciadas pelas células NK.

Fonte: MATSUDA *et al.*, 2008 (adaptado pela autora).

2.4 Gene *CD1D*

2.4.1 Estrutura e Polimorfismo

O gene *CD1D* está localizado no cromossomo 1q23.1 (ALBERTSON *et al.*, 1988) e possui 7 éxons. Os éxons 1 e 2 codificam a região 5' não traduzida (5' UTR) e o peptídeo sinal, os éxons 3, 4 e 5 codificam os domínios $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$, respectivamente. O éxon 6 codifica a região transmembrânica, enquanto o éxon 7 codifica a cauda citoplasmática e a região 3' não traduzida (3' UTR) (Figura 6). A região 5' não traduzida de *CD1D* é bastante divergente da região correspondente das demais moléculas CD1, sendo possível que essa falta de homologia se deva a algum mecanismo de regulação pós-transcricional não compartilhado por *CD1D* e as demais moléculas CD1 (BALK *et al.*, 1989).

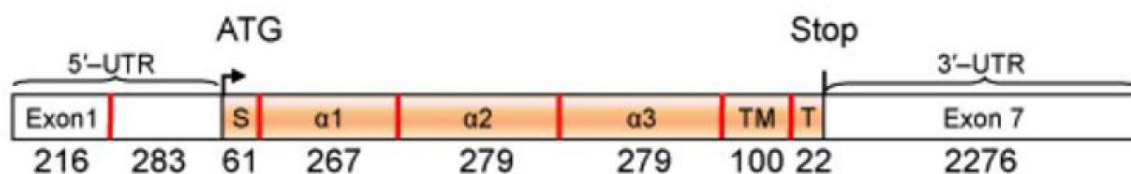


Figura 6: Representação do RNAm completo de *CD1D*. Composto por 7 éxons, cujos limites são representados pelas linhas verticais vermelhas e os tamanhos em pares de nucleotídeos indicados abaixo de cada éxon. A região traduzida encontra-se em laranja. S: peptídeo sinal. $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$: domínios da molécula, TM: região transmembrânica, T: domínio citoplasmático.

Fonte: BENAM *et al.*, 2011 (adaptado pela autora).

O gene *CD1D* é bastante conservado entre as espécies e seu polimorfismo alélico é limitado. Em 1999, Han *et al.* estudaram uma amostra composta por indivíduos de diferentes ancestralidades e descreveram um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no éxon 2 de *CD1D*, no qual a mudança de nucleotídeo A para T resulta na substituição do aminoácido treonina para serina no códon 46 da molécula; entretanto, a frequência encontrada para o alelo T foi de apenas 0,01. Após este, outros estudos mostraram que o alelo T é infrequente em diversas populações. Foi realizado na Itália um estudo de associação entre variantes dos genes *CD1* e a síndrome de Guillain-Barré, 100 controles e 65 pacientes foram genotipados e o alelo T não foi detectado (CAPORALE *et al.*, 2006). Em 2010, em um estudo com duas populações chinesas esta variação não foi detectada (GAN *et al.*, 2010), enquanto no Irã, um estudo de associação entre variantes de *CD1* e alguns tipos de cânceres encontrou apenas um indivíduo heterozigoto A/T e nenhum homozigoto T/T entre os 784 indivíduos da amostra (GOLMOGHADDAM *et al.*, 2010).

2.4.2 *Recomposição alternativa de CD1D*

O primeiro relato de recomposição alternativa em *CD1D* ocorreu em 1999, por Jenkinson *et al.*, em linhagens celulares de coriocarcinoma, nas quais foi identificada uma variante por recomposição alternativa que não possui o éxon 5. No ano seguinte, em células mononucleadas, 8 variantes (V1 a V8) foram descritas (KOJO *et al.*, 2000) sendo que uma delas (V1) correspondia à variante identificada previamente por Jenkinson e colaboradores. Segundo este estudo, o éxon 5 que codifica a região de ligação à molécula β 2-microglobulina está ausente nas variantes V1, V2, V4 e V5. Em V3, V4, V5, V6, V7 e V8 a região de ligação do antígeno é parcialmente ausente, sugerindo que essas variantes não são capazes de apresentar antígeno. Já V2 e V5 não possuem o éxon 6 e portanto não têm a região transmembrana, resultando em proteínas solúveis ou intracelulares.

A expressão de variantes de RNAm de *CD1D* foi analisada em células epiteliais dos brônquios (BENAM *et al.*, 2011). Seis variantes foram identificadas, sendo que três delas coincidem com as variantes V1, V2 e V3 identificadas por Kojo *et al.* (2000) (Figura 7). Neste estudo também foram comparados os padrões de recomposição do RNA em diferentes linhagens celulares (epitélios, células apresentadoras de antígenos, células T e fibroblastos). O resultado mostrou padrões de expressão das variantes similares entre as linhagens epiteliais, pois essas expressavam as seis variantes, enquanto que as linhagens não epiteliais expressavam apenas algumas dessas variantes.

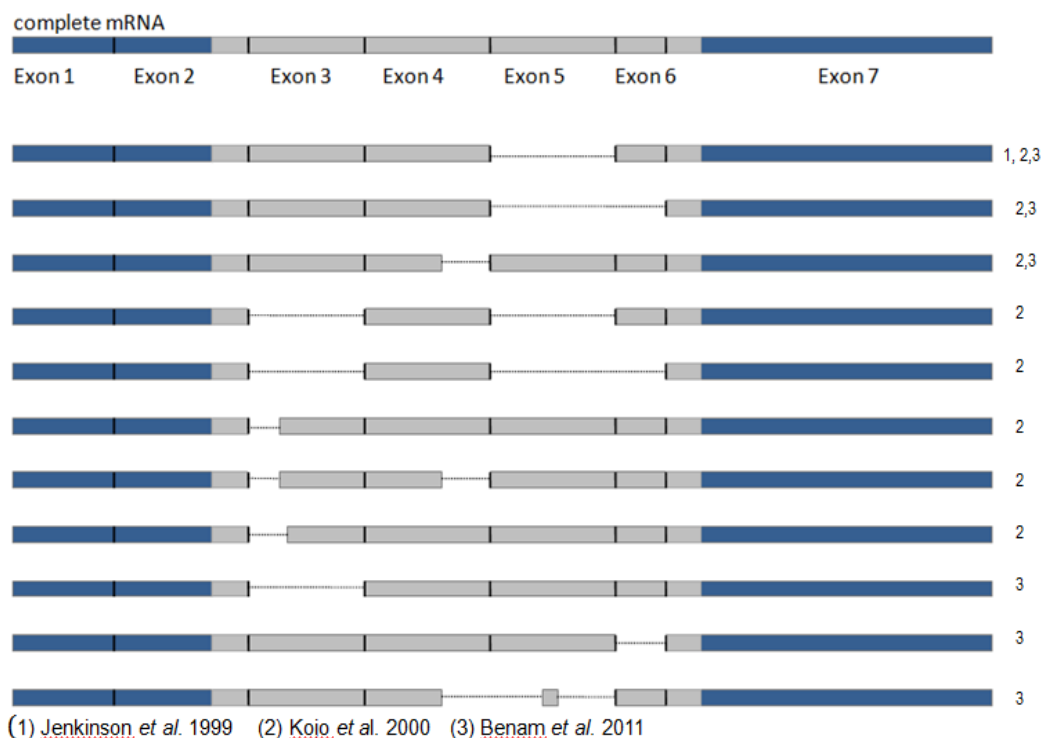


Figura 7: Representação esquemática das variantes derivadas da recomposição alternativa de *CD1D*. Os números ao lado de cada variante indicam em quais trabalhos foram detectadas, de acordo com a legenda.

2.4.3 Expressão de *CD1D* em doenças

Foi demonstrada a expressão diferencial de *CD1D* em diferentes doenças. A expressão da proteína CD1d foi encontrada aumentada em células epiteliais de fígado de pacientes com cirrose biliar primária. Foi sugerido pelos autores que as moléculas CD1d podem estar apresentando, além de antígenos microbianos, componentes lipídicos dos ductos biliares que porventura compartilhem homologia com os antígenos exógenos (TSUNEYAMA *et al.*, 1998). Em pacientes com intolerância à lactose observou-se uma elevada expressão da molécula CD1d na lâmina própria do duodeno tanto no período sintomático quanto no período assintomático, enquanto que em indivíduos saudáveis a expressão de CD1d não foi significativa (ULANOVA *et al.*, 2000). A expressão elevada da proteína CD1d em células leucêmicas circulantes foi apontada como um fator prognóstico em leucemia linfocítica crônica, a maior expressão indicaria progressão da doença para formas mais graves (ANASTASIADIS *et al.*, 2013).

Para doenças autoimunes há estudos relacionando expressão de *CD1D* com psoríase e também com artrite reumatoide (AR). Os queratinócitos de pacientes com psoríase apresentam expressão aumentada da molécula CD1d em relação aos controles. É possível que citocinas inflamatórias secretadas no local das lesões induzam a expressão de

CD1d, que por sua vez conduzem as células NKT a produzirem mais citocinas (BONISH *et al.*, 2000). Já em artrite reumatoide os níveis de CD1d solúvel foram comparados entre pacientes e controles através da quantificação da proteína no plasma, observando-se baixos níveis de CD1d em pacientes quando comparado com indivíduos saudáveis. A hipótese considerada é que a menor expressão de CD1d levaria a um menor número de células NKT ativadas, de maneira que funções importantes dessas células poderiam estar prejudicadas e isso contribuiria para a patogênese da artrite reumatoide (SEGAWA *et al.*, 2009). Este resultado de subexpressão foi o mesmo encontrado pela quantificação do RNAm da variante solúvel de *CD1D* em PBMC (Células Mononucleares do Sangue Periférico, do inglês Peripheral Blood Mononuclear Cells) de pacientes de AR (KOJO *et al.*, 2003).

2.5 Expressão de *CD1D* em pênfigo foliáceo

Os resultados do estudo do perfil de expressão gênica de linfócitos T CD4⁺ em pacientes e controles de pênfigo foliáceo revelaram múltiplos genes diferencialmente expressos (MALHEIROS, 2009; MALHEIROS *et al.*, manuscrito submetido para publicação), sendo importantes geradores de hipóteses. O resultado obtido para o gene *CD1D* foi uma das principais motivações para a idealização do presente trabalho. Foram realizadas comparações entre diferentes subgrupos de pacientes e controles, sendo que para *CD1D* foi obtido o seguinte resultado: expressão 4 vezes superior em pacientes com a forma generalizada do pênfigo em relação aos indivíduos controles. Expressão 1,8 vezes inferior em pacientes sob tratamento imunossupressor em relação aos pacientes sem tratamento. Expressão 3,2 vezes superior em pacientes com a forma generalizada do pênfigo em relação aos pacientes com a forma localizada da doença. Expressão 4,4 vezes superior em pacientes de pênfigo vulgar em relação aos controles. Expressão 4 vezes mais elevada em tecido epitelial lesionado de pacientes em relação ao tecido não lesionado dos mesmos. A tabela 1 resume as comparações e resultados encontrados por Malheiros, 2009.

A conclusão desse trabalho foi de que *CD1D* possivelmente desempenha algum papel na patogênese do pênfigo, sugerindo-se que células NKT e antígenos lipídicos também podem estar envolvidos no desenvolvimento da doença.

Tabela 1. Comparações Trabalho Malheiros, 2009			
	microarranjo	qPCR	
PF generalizado sem tratamento	5,6x	4x	Controles
PF generalizado com tratamento	-3,1x	-1,8x	PF generalizado sem tratamento
PF generalizado sem tratamento	2,8x	3,2x	PF localizado
Tecido epitelial lesionado		4x	Tecido epitelial normal

Tabela 1. Comparações e resultados do trabalho de Malheiros, 2009. Os valores correspondem a diferença de expressão, considerando o grupo da coluna à esquerda em relação ao grupo da direita.

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Compreender os fatores genéticos implicados na autoimunidade da doença pênfigo foliáceo é um dos focos de nosso grupo de pesquisa, e é nesse amplo objetivo que o presente trabalho se insere. A proposta deste trabalho é estudar a expressão do gene *CD1D* em nível de RNAm, visando investigar os resultados obtidos por um estudo anterior de nosso grupo de pesquisa (vide informação no tópico anterior), no qual foi demonstrada a expressão aumentada desse gene em pacientes de pênfigo foliáceo.

Diante deste contexto nosso objetivo geral é analisar a expressão de *CD1D* em diferentes tipos celulares e verificar se há diferenças significativas no padrão de expressão dos RNAm variantes deste gene em pacientes de PF e indivíduos controle.

Nossos objetivos específicos são:

- Avaliar quantitativamente a expressão do gene *CD1D* em monócitos, células B IgG+ e B IgG- do sangue venoso periférico em pacientes de pênfigo foliáceo e indivíduos controle.
- Descrever quais variantes de RNAm do gene *CD1D* estão presentes em monócitos, células B IgG+, B IgG- do sangue venoso periférico. Comparar qualitativamente o perfil de expressão dessas variantes entre pacientes de pênfigo foliáceo e indivíduos controles.

4 ARTIGO

CD1d and pemphigus foliaceus: An mRNA expression analysis

Authors and affiliations

Sara Cristina Lobo Alves¹, Maria Luiza Petzl-Erler¹

¹ Human Molecular Genetics Laboratory, Department of Genetics, Federal University of Parana, Curitiba, Brazil

Abstract

Pemphigus foliaceus is an epidermal autoimmune disease characterized by pathogenic autoantibodies against desmoglein 1, an important cell-cell adhesion protein. It is a blistering disease characterized by erosive lesions in the upper epidermal layers of the skin. Pemphigus foliaceus pathogenesis is not completely understood, yet, genetic and environmental factors generate and modulate the autoimmune response. The *CD1D* gene encodes an MHC class I like glycoprotein (CD1d) whose main function is presenting glycolipid antigens to natural killer T (NKT) cells. The *CD1D* mRNA was recently reported as overexpressed in T CD4⁺ cells of pemphigus patients when compared with healthy individuals. The aim of this work was compare the *CD1D* expression and the mRNA variants expression pattern in monocytes, IgG+ and IgG- B lymphocytes between patients and controls. We found that in monocytes *CD1D* mRNA is underexpressed in patients with ($P = 0.0079$ expression difference - ED = 0.44) and without lesions ($P = 0.0028$ ED = 0.30). Furthermore, the mRNA represented by 1C band (with complete exons 3 and 4) was significantly less frequent in patients than in controls ($P = 0.011$). For B cells there were not found statistically significant differences in the level of CD1d mRNA between pemphigus patients and controls (IgG+ B cells ED = 1.84 $P = 0.1829$ / IgG- B cells ED = 5.28 $P = 0.1508$). These results led us to conclude that the expression of *CD1D* is altered in pemphigus foliaceus and point to participation of NKT cells and glycolipid antigens in pemphigus. The role of *CD1D* and its expression at the RNA and protein levels in pemphigus and other autoimmune diseases should be focused in future studies.

Introduction

Pemphigus foliaceus (PF) is an autoimmune disease characterized by autoantibodies against desmoglein 1 (DG1), a desmosomal cell-adhesion protein expressed in keratinocytes (Jones *et al.*, 1984). The main clinical feature of PF is the formation of intra-epidermal blisters due the loss of adhesion between keratinocytes, a process called acantholysis (Diaz *et al.*, 1989). In Brazil, pemphigus foliaceus is endemic and is also known as *fogo selvagem* (FS) (meaning “wild fire”). Epidemiologic features point to important roles of environmental and genetic factors in FS etiology. Several environmental factors have been speculated to be involved in the FS pathogenesis, including poor living conditions and hematophagous insects bites. There is a suspicion that hematophagous insects that live in the endemic area could be inoculating salivary substance or some infectious agent which may start an antibody response that cross-reacts with the desmoglein 1 protein (Lombardi *et al.*, 1992; Qian *et al.*, 2013). The participation of genetic factors in the disease has been demonstrated by diverse studies. The first and strongest genetic associations ever found are with the HLA class II genes (Petzl-Erler and Santamaria, 1989; Pavoni *et al.*, 2003). Other genes that have been found associated with PF are *CD40L*, *CD40*, *BLYS* (Malheiros *et al.*, 2009) *IL4*, *IL6* (Pereira *et al.*, 2004) *PDCD1* (Braun-Prado *et al.*, 2007), *CD28*, *CD86*, and *CTLA4* (Dalla-Costa *et al.*, 2010) and *CIITA* (Piovezan and Petzl-Erler, 2013).

CD1d is a member of the CD1 family of major histocompatibility (MHC) class I-like glycoproteins. Both MHC and CD1 molecules consist of a heavy chain, formed by the assembly of three extracellular domains, $\alpha 1$, $\alpha 2$ and $\alpha 3$; in non covalent association with $\beta 2$ -microglobulin (Porcelli *et al.*, 1999). Unlike the classical MHC (HLA) class I molecules, CD1 proteins are mostly non-polymorphic and present non-peptides molecules to T lymphocytes. CD1d presents self and foreign glycolipids to NKT cells, a CD1d-restricted T lymphocyte population, that is able to produce and release cytokines quickly, which leads to other cells activation and immune responses modulation (Park and Bendelac, 2000).

The *CD1D* gene is localized on chromosome 1q23.1 (Alberteson *et al.*, 1988). It is expressed in most of antigen presenting cells (macrophages, dendritic cells, B cells), in activated T cells (Exley *et al.*, 2000) and in some epithelial cells (Canchis *et al.*, 1993). Studies have detected differential expression of CD1d in some diseases. Increased CD1d expression was found in epithelioid granuloma cells from primary biliary cirrhosis patients (Tsuneyama *et al.*, 1998). In psoriasis, CD1d was overexpressed in patients' keratinocytes (Bonish *et al.*, 2000). Higher CD1d expression defines a subpopulation of chronic lymphocytic leukemia patients with a more aggressive clinical course (Anastasiadis *et al.*, 2013). The plasma of rheumatoid

arthritis (RA) patients was assessed and the results pointed to a decrease of soluble CD1d levels (Segawa *et al.*, 2009). For pemphigus foliaceus a recent global RNA expression analysis demonstrated CD1d overexpression in CD4⁺ T cells from peripheral venous blood and in lesional skin of patients (MALHEIROS, manuscript in preparation). Given this evidence of CD1d involvement in pemphigus pathogenesis we aimed to quantify *CD1D* mRNA in patients and controls in IgG⁺ and IgG⁻ B cells and monocytes and verify the *CD1D* splicing variants expression pattern in these cell types and investigated if there is differential expression between patients and controls.

Material and Methods

Population sample

Our sample consisted of three groups: patients with active lesions (aPF, B lymphocytes n=7, monocytes n= 8), patients without lesion (iPF, B lymphocytes n=6, monocytes n=5), and a control group (B cells n=5, monocytes n=9). All patients were under treatment. The disease diagnosis was based on clinical and immunohistochemical criteria. Patients blood samples were collected at the Hospital Adventista do Pênfigo (n=19), in Campo Grande, Mato Grosso do Sul state and at the Hospital do Fogo Selvagem Lar da Caridade (n=3), in Uberaba, Minas Gerais state. Controls samples were collected in Campo Grande (n=3) and in Curitiba (n=10), Paraná state. Patients' sample is partially overlapping between the cell types, so, not all subjects were evaluated for all cell types. All participants in this study were informed about the purpose of it and signed a consent form for research participation.

Isolation of monocytes, IgG⁺ and IgG⁻ B lymphocytes

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from 50 ml of peripheral venous blood by density barrier centrifugation using Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich Inc., USA) according to the manufacturer's instructions. Monocyte and B lymphocyte (IgG⁺ and IgG⁻) subpopulations were isolated using magnetic cell separation columns and beads (Macs-Miltenyi Biotec, Germany). CD14⁺ monocytes and CD19⁺ B cells were isolated from different fractions of PBMC using anti-CD14 and anti-CD19 magnetic beads, respectively. The B cell fraction was then separated into IgG⁺ and IgG⁻ fractions using anti-IgG magnetic beads. The separations resulted in enrichment of the desired cell type.

RNA extraction and reverse transcription

RNA from IgG+ and IgG- B lymphocytes and monocytes was extracted by mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, USA) according to the manufacturer's protocol. Complementary DNA (cDNA) was obtained by reverse transcription performed with High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, USA).

CDID mRNA quantification

The relative mRNA expression of *CDID* was estimated by quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) performed using *CDID* hydrolysis probe purchased as Taqman inventoried assay (Hs00939888-m1, Applied Biosystems). Hydrolysis probe for the reference gene *GUSB* (Hs00939627_m1) was used for normalizing mRNA concentrations. An aliquot of cDNA was used as template in a 10 µl qPCR reaction containing Taqman Master Mix and hydrolysis probe (Applied Biosystems). The duplicate reactions were carried out in the Mastercycler ep Realplex (Eppendorf, Germany). *CDID* hydrolysis probe covers the 5-6 exon boundary and produces a 63bp fragment.

CDID mRNA variants analysis

The cDNA was subjected to polymerase chain reactions (PCRs) with two primer pairs previously described named *CDID* C and *CDID* D (Benam *et al.*, 2011). The primer pair C covers the exon two to four, while the D primers cover the exon two to seven (figure 1). The reactions contained 2 µl of 1x buffer, 2 µM of MgCl₂, 0.5 µM of each forward and reverse primers, 0.2 µM of dNTPs, 0.1 U/µl of Platinum Taq DNA Polymerase, 2 µl of cDNA, and ultrapure water totaling a 20 µl of final volume. The thermocycling conditions consisted of initial desnaturation at 95°C for 10 minutes, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds intercalated with annealing at 58°C or 54°C, for primer pairs C and D respectively, and extension at 72°C for 1 minute. To finalize the reaction a final extension at 72°C for 1 minute was followed by 10°C for 1 minute. The PCR products were separated in agarose gel electrophoresis (3% of agarose, 3 hours at 70 volts) and stained with ethidium bromide.

cDNA sequencing

PCR products were extracted from the gel and sequenced using the BigDyeR Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, UK) and analyzed using a 3500 ABI capillary electrophoresis system (Applied Biosystems, UK).

Statistical Analysis

The relative mRNA expression evaluated by q-PCR was quantified using the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method (Livak *et al.*, 2001). Data were evaluated by two-tailed Mann-Whitney nonparametric test, in order to compare groups taken two by two. Analyses were done using the GraphPad Prism software version 6.01. To test the correlation between two groups, Pearson product-moment correlation coefficient was accessed using the BioEstat 5.0 statistical software (Ayres *et al.*, 2007).

The presence and absence of mRNA bands in agarose gel were compared between patients and controls. For those that were not present in all subjects, the frequency of presence/absence was compared between the studied groups by Metropolis Algorithm in 2x2 contingency tables, using the computational program RxC (Miller *et al.*, 1997).

P values less than 0.05 were adopted as the significance limit in all statistical tests.

Results

CD1D mRNA quantification

The relative *CD1D* mRNA levels were estimated by qPCR in monocytes, IgG+ and IgG- B cells in subgroups of pemphigus patients and controls.

In monocytes, *CD1D* mRNA level was significantly lower (0.42 fold) in patients than in unaffected controls ($P = 0.0007$, Figure 2A and Table 1). In patients with and without active lesions *CD1D* expression was 0.44 ($P = 0.0079$) and 0.30 ($P = 0.0028$) fold lower than in unaffected controls, respectively. No significant difference was found between the two groups of patients ($P = 0.202$).

In IgG+ and IgG- B cells, unlike in monocytes, no significant differences in *CD1D* mRNA expression were found between patients and controls (Figure 2B, 2C and table 1). Despite that, we suggest that B cells should be analyzed in a larger sample in future studies, once we found expression differences but the *P* values were not significant (IgG+ B cells ED = 1.84 $P = 0.1829$ / IgG- B cells ED = 5.28 $P = 0.1508$). The Pearson Correlation analyses demonstrated a strong positive correlation between IgG+ B cells and IgG- B cells of patients with lesions ($r = 0.926$ $P = 0.027$) and of patients without lesion ($r = 0.862$ $P = 0.027$) and for the two patients groups together ($r = 0.87$ $P = <0.0001$). For the control group we obtained moderate correlation ($r = 0.737$ $P = 0.1553$).

CD1D mRNA variants

cDNA amplification and electrophoresis were performed to verify the existence of splicing *CD1D* variants in B cells and monocytes. Using the *CD1D* C primer pair we obtained from four to six bands, according to the cell type. The longest segment amplified by this primer pair has 572 bp (figure 3B). The amplification with *CD1D* D primer pair resulted in five to six bands and the amplicon maximum length is 636bp (Figure 3A). Individual bands were designated according to the numbers attributed to them in Figure 3.

Presence and absence of bands were analyzed in a qualitative evaluation of the gels and differences between patients and controls were observed (Table 2). In monocytes, band 1C (amplified with C primers) was present in all ten control subjects while in patients it was significantly less frequent. In patients with active disease (aPF), it was present in four of eight patients ($P = 0.011$) and in patients without lesions (iPF), it was present in two of five patients ($P = 0.032$). Two other comparisons showed significant P values, but our small sample size (Table 3), mainly for the iPF subgroup probably affected the results. Initially, we aimed to sequence the cDNA eluted from all the bands visualized in the agarose gel but in some cases the cDNA yield after purification was too little for the sequencing reaction. Nevertheless, four bands were sequenced successfully: bands 1D, 4D and 5D with the D primers and band number 1C obtained in a PCR reaction with the C primers. Comparing our results with those of Benam *et al.* (2011) we conclude that band number 1D (636bp) has the same sequence reported as full length *CD1D* mRNA. Band 4D (357bp) is the mRNA variant named V4, while 5D (257bp) sequence is the same as V5 spliced mRNA (Figure 4A). For bands amplified with C primers, 1C (572bp) is the full length mRNA. The sequencing of other bands was not conclusive, but the molecular size obtained for them in the electrophoresis and results of Benam *et al.* (2011) led us to hypothesize that band 4C is the variant named V1 (305bp), band 2D is the V3 (504bp) and band 6D is the V6 (225bp) (Figure 4B). Moreover, the existence of band 3D and bands 2C, 3C, 5C, 6C, 7C raised the hypothesis that new *CD1D* spliced variants exist.

Discussion

The CD1d molecule has been shown as having an important role in human health due to its function of presenting glycolipid antigens to NKT cells. This cell modulates other immune system cells, such as NK cells, dendritic cells, B cells and T cells. The NKT cells are generally in low number, but after activation they are able to proliferate and release cytokines

quickly. Increased *CD1D* mRNA expression in pemphigus foliaceus was seen in a previous study of CD4⁺ T cells isolated from peripheral venous blood (MALHEIROS, manuscript in preparation) and prompted us to deepen the *CD1D* expression analysis in that disease.

Among the NKT cells, the best characterized and most studied group is the invariant NKT cells (iNKT). The iNKT possess the ability to direct the immune response towards Th1 or Th2 profiles, depending on the cytokines they produce. According to Gumprez *et al.* (2002) CD4⁺ iNKT cells can produce both Th1 as Th2 cytokines, whereas CD4⁻ iNKT cells predominantly produce pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IFN- γ .

The importance of CD1d and NKT cells has been reported in a wide range of autoimmune diseases. In type 1 diabetes (T1D) protection of prediabetic NOD mice from developing the T1D was observed through enriching the population of NKT cells by intravenous injection (Hammond *et al.*, 1998). Corroborating the protective role of NKT cells, another study showed that increasing CD1d expression restores the immunoregulatory function of NKT cells and prevents autoimmune diabetes (Falcone *et al.*, 2004). In rheumatoid arthritis, the circulating NKT cells are numerically reduced (van der Vliet *et al.*, 2001), levels of soluble CD1d were also observed decreased in patients with RA (Kojo *et al.*, 2003; Segawa *et al.*, 2009). In patients with systemic lupus erythematosus NKT cells were found in lower numbers (van der Vliet *et al.*, 2001), but on the other hand the administration of the glycolipid α -GalCer exacerbated the disease, indicating a possible pathogenic role of NKT cells in lupus (Zeng *et al.*, 2003). In psoriasis a large number of NKT cells were seen in patients' skin (Ottaviani *et al.*, 2006) and also a higher expression of CD1d was found in patients' keratinocytes (Bonish *et al.*, 2000). These studies highlight the complexity of the role of NKT cells and CD1d molecule in immune responses and autoimmune diseases. According to these results, the activity and action of NKT cells follows no standard and varies depending on the disease.

In pemphigus foliaceus patients, increased expression of *CD1D* mRNA was seen in circulating CD4⁺ T cells and in lesional skin (Malheiros, 2009, manuscript in preparation). Different subgroups of patients were evaluated and CD1d was found 5 fold more expressed in patients with generalized lesions when compared with controls, 3.1 fold more expressed in patients without treatment than in patients under treatment, 2.8 fold more expressed in patients with generalized lesions than in patients with localized lesions. Biopsies were also analyzed and *CD1D* mRNA was found 4 fold more expressed in injured epithelial tissue than in non injured epithelial tissue from patients. In the present study we evaluated the expression of CD1d in three other cell types, IgG⁻ and IgG⁺ B lymphocytes and monocytes, because

they are known to express *CD1D* (Exley *et al.*,2000). Our results corroborate the importance of CD1d in pemphigus disease once we found difference in *CD1D* mRNA expression between patients and controls. For B IgG- and B IgG+ lymphocytes we did not found statistically significant differences, probably because the number of individuals analyzed is small and variation of expression levels between individuals is high, it would be of interest to analyze expression of *CD1D* at the levels of mRNA and of the protein in a larger sample in future studies. In monocytes statistically significant differences were found. The *CD1D* mRNA was less expressed in patients than in controls. The *CD1D* underexpression found on monocytes agrees with studies that demonstrated a protective role for CD1d in autoimmune diseases, like Kojo *et al.* (2003) who found reduced levels of *CD1D* mRNA in PBMC of peripheral blood of rheumatoid arthritis patients. Yet, they are difficult to reconcile with the results of Malheiros (2009), who reported increased levels of *CD1D* mRNA in T CD4 + cells in pemphigus patients. Overall, the results of the present study taken together with those of Malheiros (2009) point to the divergence of CD1d expression among cell types in the same disease, pemphigus foliaceus. Discrepant results between cell types is not unexpected and may result from differential regulation of transcription or differential stimulation of the cells during the immune responses or also from different responses to treatment or, more likely, from interaction of all these factors. We also have to consider the high exposure of pemphigus patients to opportunistic infections that would possibly affect the *CD1D* expression.

The presence/absence of mRNA variants was evaluated by comparison between patients and controls for the frequency of the bands present in the agarose gels, after electrophoresis of cDNA. In monocytes, the 1C band, that represents *CD1D* mRNA with exons 3 and 4, was less frequent in patients than in controls. These exons code for $\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains, respectively, that together will form the lipid-binding groove (Zeng *et al.* 1997; Koch *et al.* 2005) required for glycolipid binding and presentation. These results lead us to hypothesize that the pos-transcriptional regulation of *CD1D* can be altered in pemphigus disease. The alternative splicing of messenger RNA is known to be important in the regulation of gene expression. The relationship of this process with autoimmune diseases has been reviewed by Evsyukova *et al.* (2011) who concluded that the change in the pattern of alternative splicing may be an extremely important factor in the pathogenesis of autoimmune diseases, including multiple sclerosis, rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Evidence of differential expression in complete CD1d mRNA between patients and controls demonstrated in this paper highlights a new approach in the investigation of the pathogenesis of pemphigus.

Although it needs further experiments to more accurate conclusions our results corroborate the importance of alternative splicing in autoimmune diseases.

Conclusion

In monocytes, *CD1D* mRNA was underexpressed in pemphigus foliaceus patients. In IgG⁺ and IgG⁻ B cells were not found statistically significant differences in the *CD1D* mRNA level between patients and controls. Furthermore, the *CD1D* mRNA represented by band 1C (with exon 3 and 4) was less common in patients than in unaffected individuals. These results indicate that the transcriptional and posttranscriptional regulation of *CD1D* may be altered in pemphigus, at least in some of the cell types involved in immune responses. This study indicates that *CD1D* may play a role in pemphigus pathogenesis or is altered as a result of the disease. In addition, glycolipid antigens and NKT cells may be involved in the development of PF. Future studies should clarify the possible functional significance of these findings.

References

- Albertson DG, Sherrington P, Fishpool R, Nacheva E, Milstein C. Sensitive and high resolution in situ hybridization to human chromosomes using biotin labeled probes: Assignment of the human thymocyte CD1 antigen genes to chromosome 1. **EMBO Journal** 1988; 7:2801-5.
- Anastasiadis A, Kotsianidis I, Papadopoulos V, Spanoudakis E, Margaritis D, Christoforidou A, Gouliaintzi S, Tsatalas C. CD1d expression as a prognostic marker for chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia and Lymphoma**, 2013. Available in <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2013.803222>
- Ayres M, Ayres MJ, Ayres DL, Santos AS. BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas de ciências biomédicas. Sociedade Civil Mamirauá, Belém, 2007.
- Benam KH, Kok WL, McMichel AJ, Ho L-P. Alternative Spliced *CD1D* Transcripts in Human Bronchial Epithelial Cells. **PLoS ONE** 2011; 6(8): e22726. doi:10.1371/journal.pone.0022726.
- Bonish B, Jullien D, Dutronc Y, Huang BB, Modlin R, Spada FM, Porcelli SA, Nickoloff BJ. Overexpression of *CD1D* by keratinocytes in psoriasis and *CD1D*-Dependent IFN- γ Production by NK-T Cells. **Journal of Immunology** 2000; 165:4076–85.
- Braun-Prado K, Petzl-Erler ML. Programmed cell death 1 gene (PDCD1) polymorphism and pemphigus foliaceus (fogo selvagem) disease susceptibility. **Genetics Molecular Biology** 2007; 30: 314.
- Canchis PW, Bhan AK, Landau SB, Yang L, Balk SP, Blumberg RS. Tissue distribution of the non-polymorphic major histocompatibility complex class I-like molecule, CD1d. **Immunology** 1993; 80: 561-5.
- Dalla-Costa R, Pincerati MR, Beltrame MH, Malheiros D, Petzl-Erler ML. Polymorphisms in the 2q33 and 3q21 chromosome regions including T cell coreceptor and ligand genes may influence susceptibility to pemphigus foliaceus. **Human Immunology** 2010; 71: 809.

Diaz LA, Sampaio SAP, Rivitti EA, Martins CR, Cunha PR, Lombardi C, et al. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem): II. Current and historical epidemiologic studies. **The Journal of Investigative Dermatology** 1989; 92:4-12.

Evsyukova J, Somarelli JA, Gregory SG, Garcia-Blanco MA. Alternative Splicing in Multiple Sclerosis and other autoimmune diseases. **RNA Biology** 2011;7:462-73

Exley M, Garcia J, Wilson SB, Spada F, Gerdes D, Tahir SMA, et al. CD1d structure and regulation on human thymocytes, peripheral blood T cells, B cells and monocytes. **Immunology** 2000; 100: 37–47.

Falcone M, Facciotti F, Ghidoli N, Monti P, Olivieri S, Zaccagnino L et al. (2004) Up-regulation of CD1d expression restores the immunoregulatory function of NKT cells and prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. **Journal of Immunology** 2004; 172:5908–16.

Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, Brenner MB. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. **Journal of Experimental Medicine** 2002; 195:625–36.

Hammond KJ, Poulton LD, Palmisano LJ, Silveira PA, Godfrey DI, Baxter AG. Alpha/beta-T cell receptor (TCR) +CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. **The Journal of Experimental Medicine** 1998; 187:1047–56.

Jones JC, Arnann J, Stachelin LA, Goldman RD. Human antibodies against desmosomes: possible causative factors in pemphigus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 1984; 81:2781-5.

Koch M, Stronge VS, Shepherd D, Gadola SD, Mathew B. The crystal structure of human CD1d with and without alpha-galactosylceramide. **Nature Immunology** 2005; 6: 819–26.

Kojo S, Tsutsumi A, Goto D, Sumida T. Low expression levels of soluble CD1d gene in patients with rheumatoid arthritis. **The Journal of Rheumatology** 2003; 30:2524–8.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method. **Methods** 2001; 25: 402-8.

Lombardi C, Borges PC, Chaul A, Sampaio SAP, Rivitti EA, Freidman H, et al. Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (Fogo selvagem). "The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research". **The Journal of Investigative Dermatology** 1992; 98:847-50.

Malheiros D, Petzl-Erler ML. Individual and epistatic effects of genetic polymorphisms of B-cell co-stimulatory molecules on susceptibility to pemphigus foliaceus. **Genes Immunology** 2009; 10:547

Miller, MP. RxC: A program for the analysis of contingency tables via the Metropolis Algorithm. **Computer software distributed by author**, 1997.

Ottaviani C, Nasorri F, Bedini C, de Pita O, Girolomoni G, Cavani A (2006) CD56brightCD16(-) NK cells accumulate in psoriatic skin in response to CXCL10 and CCL5 and exacerbate skin inflammation. **European Journal of Immunology** 2006; 36:118–28.

Park S-H, Bendelac A. CD1-restricted T-cell responses and microbial infection. **Nature** 2000; 406:788-92.

Pavoni DP, Roxo VMMS, Marquart Filho A, Petzl-Erler ML. Dissecting the associations of endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. **Genes and Immunity** 2003, 4: 110-6.

Pereira NF, Hansen JA, Lin MT, Roxo VM, Braun K, Petzl-Erler ML. Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for IL6 variants. **Cytokine** 2004; 28: 233.

Petzl-Erler ML, Santamaria J. Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? **Tissue Antigens** 1989; 33: 408-414.

Piovezan BZ, Petzl-Erler ML. Both Qualitative and quantitative genetic variation of MHC Class II molecules may influence susceptibility to autoimmune diseases: the case of endemic pemphigus foliaceus. **Human Immunology** 2013;74:1134-40.

Porcelli SA, Modlin RL. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. **Annual Review of Immunology** 1999; 17:297–329

Qian Y, Jeong JS, Maldonado M, Valenzuela JG, et al. Cutting Edge: Brazilian Pemphigus Foliaceus Anti-Desmoglein 1 autoantibodies cross-react with sandy fly salivary LJM11 antigen. **The Journal of Immunology** 2013; 189:1535-1539.

Segawa S, Goto D, Yoshiga Y, Hayashy T, Matsumoto I, Ito S, Sumida T. Low levels of soluble *CD1D* protein alters NKT cell function in patients with rheumatoid arthritis. **International Journal of Molecular Medicine** 2009; 24:482-6.

Tsuneyama K, Yasoshima M, Harada K, Hiramatsu K, Gershwin ME, Nakanuma Y. Increased *CD1D* Expression on Small Bile Duct Epithelium and Epithelioid Granuloma in Livers in Primary Biliary Cirrhosis. **Hepatology** 1998; 28:620-3.

van der Vliet HJ, von Blomberg BM, Nishi N, Reijm M, Voskuyl AE, van Bodegraven AA et al. Circulating V α 24+ V β 11+ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage. **Clinical Immunology** 2001;100:144–8.

Zeng Z, Castano AR, Segelke BW, Stura EA, Peterson PA. (1997) Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. **Science** 1997; 277: 339–345.

Zeng D, Liu Y, Sidobre S, Kronenberg M, Strober S. Activation of natural killer T cells in NZB/W mice induces Th1-type immune responses exacerbating lupus. **The Journal of Clinical Investigation** 2003; 112:1211–22.

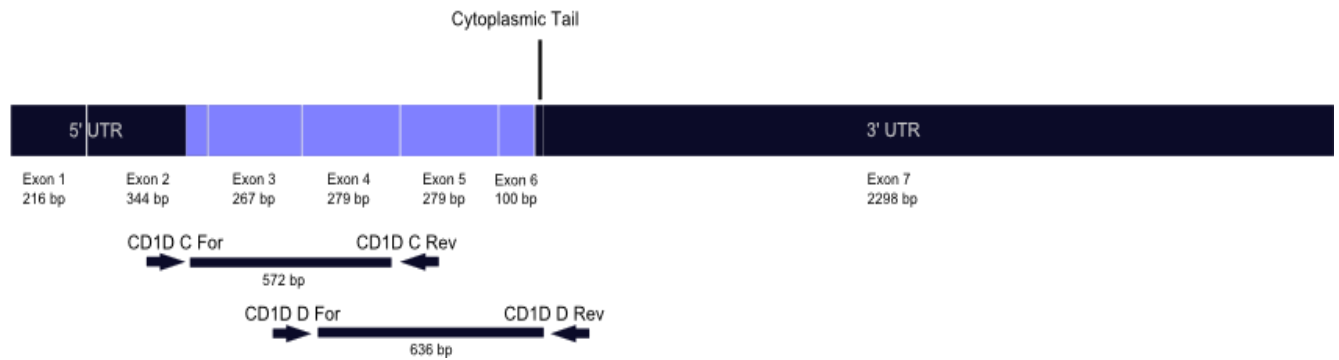
mRNA *CD1D*

Figure 1: Schematic representation of complete *CD1D* mRNA. The arrows indicate the primers annealing sites. The expected amplicons sizes are showed. Black boxes are non-coding exons and gray boxes are coding exons. *CD1D C* forward/reverse amplicon starts in base 295 of exon 2 and ends in base 254 of exon 4. *CD1D D* forward/ reverse amplicon starts in base 44 of exon 4 and ends in base 23 of exon 7.

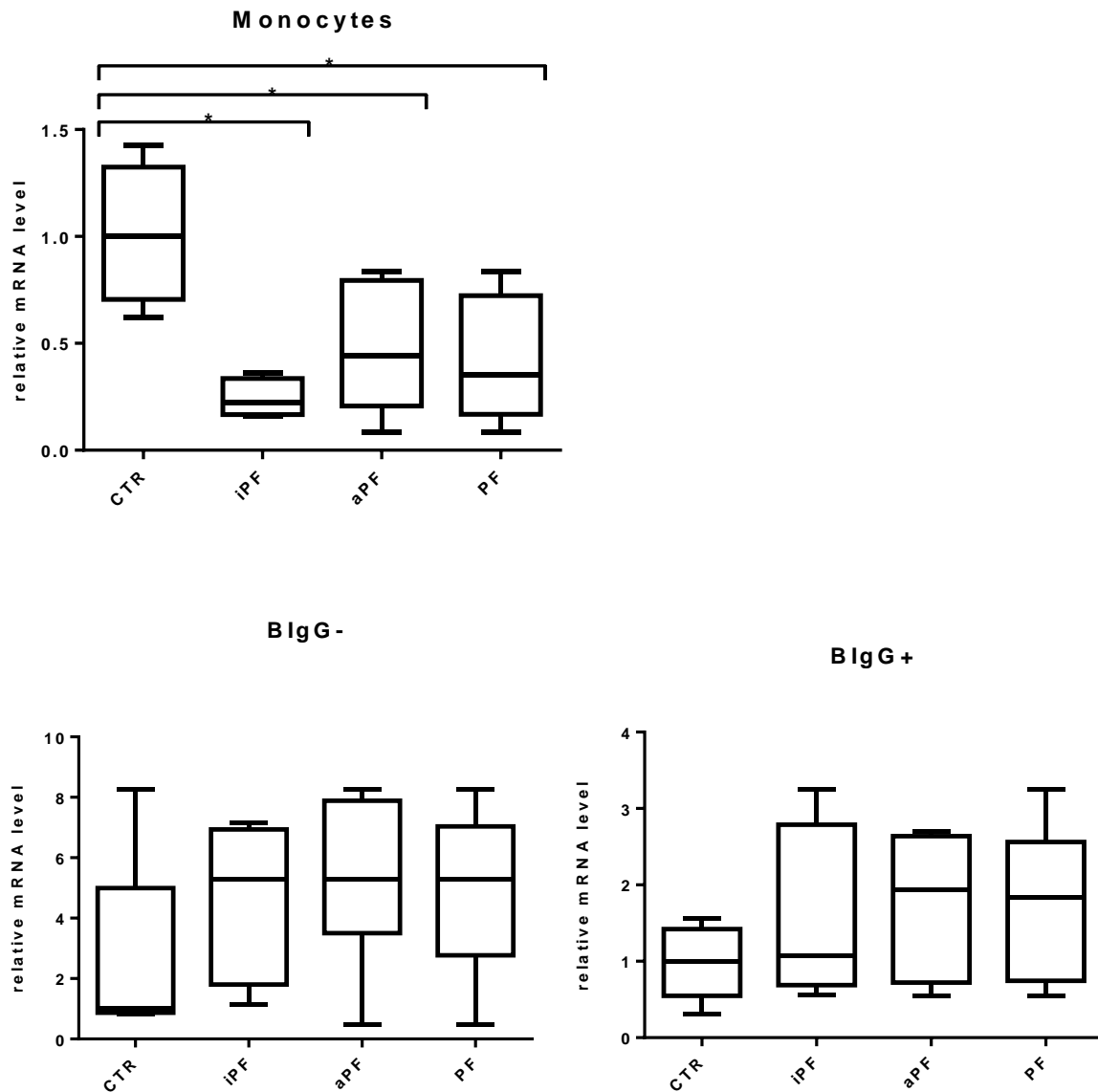


Figure 2: Relative *CD1D* mRNA levels assessed by qRT-PCR . A: Monocytes B: IgG- B cells, C: IgG+ B cells. CTR healthy controls, iPF patients without lesions. aPF: patients with active lesions, PF: iPF plus aPF. Data are shown as a box-plot, where the bar within the box represents the median value, the outlines of the boxes show the 25th and the 75th percentiles and the bars outside the boxes represent the minimum and maximum values of the distribution. *indicate statistically significant differences.

Table 1: Comparison of *CD1D* mRNA levels in different cell types isolated from peripheral blood: comparison between the four analyzed samples, two by two.

Cell Type	aPF x CTR		iPF x CTR		iPF x aPF		PF x CTR	
	ED	<i>P</i>	ED	<i>P</i>	ED	<i>P</i>	ED	<i>P</i>
B IgG+	1.93	0.1465	1.08	0.5317	0.56	0.9369	1.84	0.1829
B IgG-	5.28	0.2816	5.31	0.1775	1.33	0.7016	5.28	0.1508
Monocytes	0.44	0.0079	0.30	0.0028	0.78	0.2020	0.42	0.0007

CTR: Control group (B cells n=5, monocytes n=9), aPF: patients with active lesions (B cells n=7, monocytes n=8), iPF: patients without lesions (B cells n=6, monocytes n=5), PF: iPF plus aPF, ED: expression difference, given as fold increase or decrease. *P*: Probability from Mann-Whithney test.

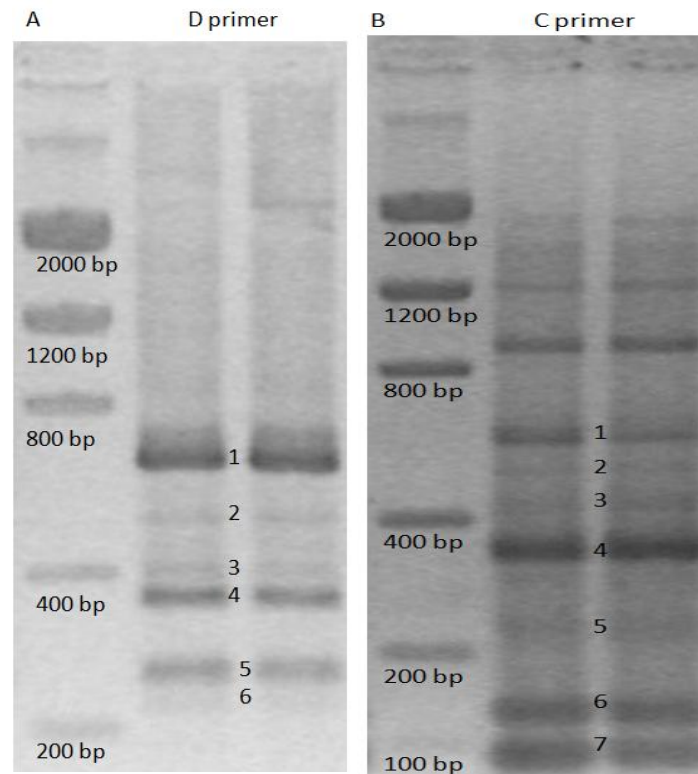


Figure 3: Example of results from electrophoresis. A: Six bands visualized with “*CD1D D*” primers. B: Seven bands visualized with “*CD1D C*” primers. The first lane is the molecular size marker. Only bands those are likely to represent mRNA variants (based on exons sizes and mRNAs already described) were numerated.

Table 2: Qualitative analysis of the presence/absence of bands

Cell Type	Band	CTR _x aPF	CTR _x iPF	CTR _x PF
		P	P	P
B IgG+	1C	0.310	0.376	0.952
	2D	0.310	0.376	0.952
	3D	0.408	0.251	0.888
B IgG-	1C	0.079	0.122	0.117
	2C	0.377	0.338	0.352
	3C	0.377	0.338	0.352
Monocytes	1C	0.011*	0.032*	0.012*
	2D	0.250	0.032*	0.103
	3D	0.250	0.032*	0.103
	6D	0.094	1.000	0.229

P: Probability.*Significant values. aPF: Patients with lesions. iPF: patients without lesions.
 PF: iPF plus aPF

Table 3: Number of subjects with presence/ absence of bands

Cell type	Band	CTR		aPF		iPF	
		P	A	P	A	P	A
B IgG+	1C	3	2	6	1	2	4
	2D	3	2	6	1	2	4
	3D	1	4	3	4	0	6
B IgG-	1C	1	4	5	2	4	2
	2C	5	0	6	1	5	1
	3C	5	0	6	1	5	1
Monocytes	1C	10	0	4	4	3	2
	2D	10	0	7	1	3	2
	3D	10	0	7	1	3	2
	6D	10	0	6	2	5	0

P: Present. A: Absent. CTR: Control group (B cells n=5, monocytes n=10), aPF: patients with active lesions (B cells n=7, monocytes n=8), iPF: patients without lesions (B cells n=6, monocytes n=5).

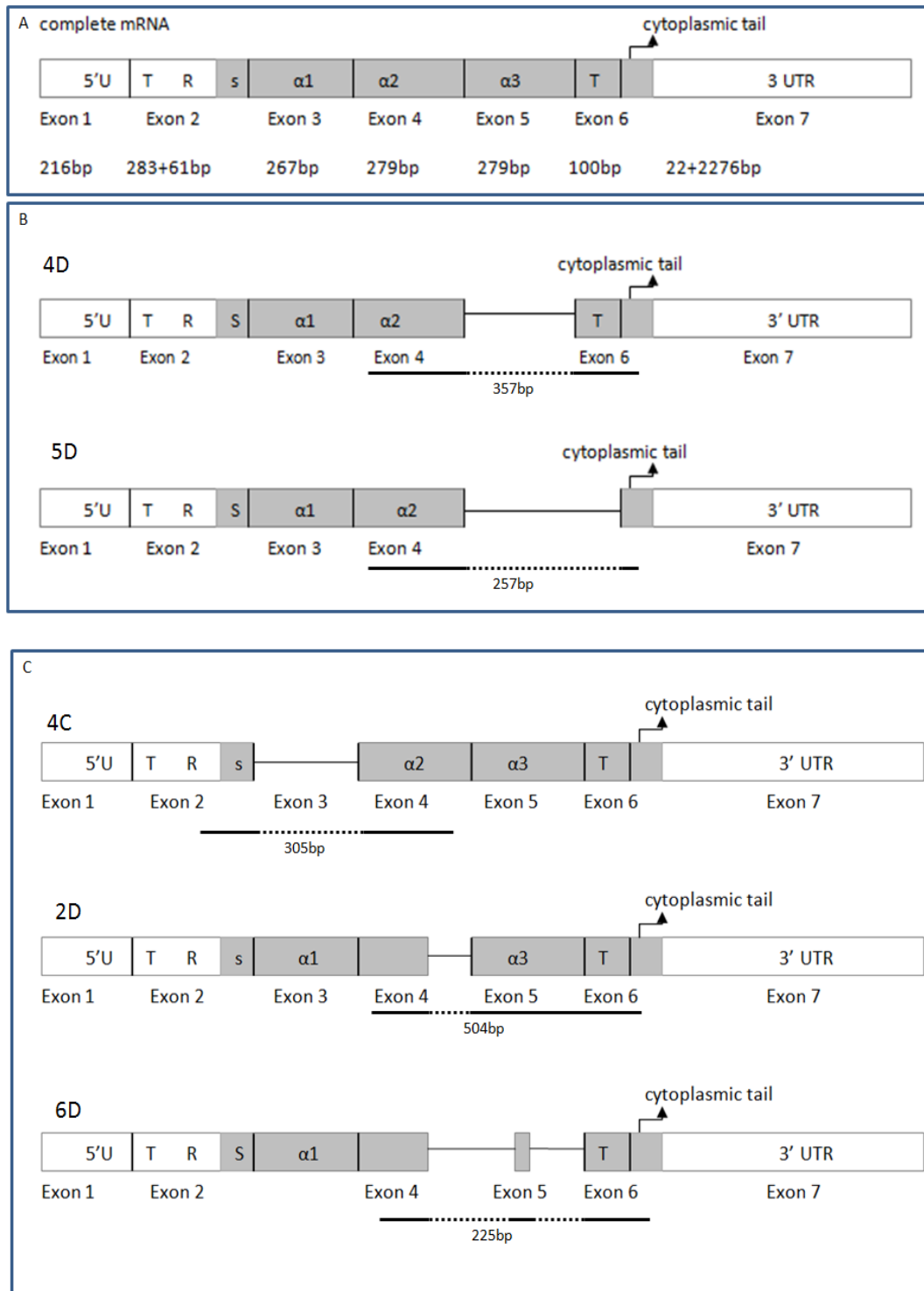


Figure 4. A: Complete *CD1D* mRNA is shown to facilitate comparison B: Sequenced *CD1D* mRNA variants structure (band 4D with the exon 5 spliced and band 5D with exon 5 and 6 spliced). C: Hypothesized *CD1D* mRNA variants structure (band 4C with exon 3 spliced, band 2D with part of exon 4 spliced and band 6D with part of exon 4 and 5 spliced). White boxes are non coding exons and gray boxes are the coding exons. Horizontal full lines represent the amplified part. Horizontal dotted lines represent the spliced part. S: signal peptide, T: transmembrane region.

5 DISCUSSÃO

O gene *CD1D* é expresso em diferentes células do sistema imune, principalmente células apresentadoras de antígeno (APCs). A função conhecida da proteína CD1d é a apresentação de antígenos glicolipídicos para células NKT, de modo que, para analisar as implicações da expressão dessa molécula precisa-se considerar o papel e a complexidade das células NKT no sistema imune.

As células NKT são um grupo especial de linfócitos cuja ativação é dependente de CD1d e são reconhecidamente importantes na modulação da imunidade inata e adaptativa. Entre as células NKT o grupo mais bem caracterizado e estudado é o das NKT invariantes (iNKT). As iNKT possuem a habilidade de direcionar a resposta imune para perfis Th1 ou Th2, dependendo das citocinas por elas produzidas. Segundo Gumprez *et al.* (2002) células iNKT CD4⁺ podem produzir tanto citocinas Th1 quanto Th2, enquanto que células iNKT CD4⁻ produzem predominantemente citocinas pro-inflamatórias, como TNF α e IFN γ . Ainda não está bem claro, no entanto, como ocorre a regulação e direcionamento para um ou outro tipo de resposta, tão contrastantes entre si.

A importância de CD1d e das NKT já foi reportado em uma ampla gama de doenças autoimunes. Em diabetes do tipo 1 (DM1) foi observado que o enriquecimento da população de células NKT através da transferência de células por injeção intravenosa em camundongos pré-diabéticos proporciona proteção ao desenvolvimento da DM1 (Hammond *et al.*, 1998). Corroborando o papel protetor das NKT, outro estudo mostrou que aumentar a expressão de CD1d reestabelece as funções imunoreguladoras das células NKT e previne a diabetes autoimune (Falcone *et al.*, 2004). Em artrite reumatoide, as células NKT circulantes se encontram numericamente diminuídas (van der Vliet *et al.*, 2001), os níveis de CD1d solúvel também foram encontrados diminuídos em pacientes de AR (Kojo *et al.*, 2003, Segawa *et al.*, 2009). Em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico células NKT foram encontradas em número reduzido (van der Vliet *et al.*, 2001), porém a administração do glicolípido α -galcer, exacerbou a doença, indicando um possível papel patogênico das NKT em lúpus (Zeng *et al.*, 2003). Já em psoríase foi visto um maior número de células NKT em pacientes (Ottaviani *et al.*, 2006) e também uma maior expressão da molécula CD1d (Bonish *et al.*, 2000). Esses trabalhos evidenciam a complexidade do papel das células NKT e da molécula CD1d nas respostas imunes, é possível perceber que a atividade e ação das NKT não segue um padrão e varia dependendo da doença e do contexto imune do indivíduo.

Em pênfigo foliáceo foi vista a expressão aumentada de *CD1D* em linfócitos T CD4+ e em tecido epitelial lesionado de pacientes (Malheiros, 2009. Malheiros, manuscrito em preparação). Foram avaliados diferentes subgrupos de pacientes e o RNA mensageiro de *CD1D* esteve mais expresso em pacientes nas diferentes comparações, sendo que a expressão era maior quanto mais grave o estado do paciente. No presente estudo avaliamos a expressão de *CD1D* em outros 3 tipos celulares, linfócitos B IgG+ e IgG- e monócitos. Nos dois tipos de células B não houve diferenças significativas na expressão entre pacientes e controles. Em monócitos, diferenças estatisticamente significativas foram encontradas, o RNA mensageiro de *CD1D* estava menos expresso em pacientes que em controles. A subexpressão de *CD1D* encontrada em monócitos concorda com trabalhos já citados que demonstraram um papel protetor para *CD1D* em doenças autoimunes, como o de KOJO *et al.* (2003) no qual foram encontrados níveis diminuídos de RNAm de *CD1D* em PBMC do sangue periférico de pacientes de artrite reumatoide, porém discorda do trabalho de Malheiros (2009). A comparação de resultados, portanto, aponta divergências quanto à expressão de *CD1D* entre tipos celulares em uma mesma doença, o pênfigo foliáceo. Resultados discrepantes entre tipos celulares não são inesperados e podem resultar de regulação diferencial da transcrição ou de estimulação diferenciada das células durante a resposta imune, ou também devido a respostas diferentes ao tratamento, ou ainda, e mais provavelmente, da interação de todos os fatores mencionados.

Os resultados encontrados corroboram a existência de uma relação entre *CD1D* e o pênfigo foliáceo. Com isso questiona-se se a alteração da expressão é parte das causas da patogênese do pênfigo ou se é decorrente do progresso da doença. Um ponto interessante e que também precisa ser considerado é a possibilidade de que infecções oportunistas (que sabidamente acometem os pacientes de pênfigo) interfiram na expressão de *CD1D*. Essa possibilidade se estabelece principalmente pelo papel desempenhado pelas células NKT na resposta a patógenos (revisado por KINJO *et al.*, 2013).

A análise do padrão de variantes de RNAm foi realizada por meio da comparação de presença/ausência de bandas em pacientes e controles. Nosso principal resultado ocorreu em monócitos, onde foi encontrada uma diferença significativa na presença da banda 1C, que segundo o sequenciamento corresponde ao RNA mensageiro de *CD1D* que possui os éxons 3 e 4. Este RNAm foi mais frequente nos controles do que em pacientes, esta observação leva à hipótese de que haja regulação pós-transcricional alterada em pênfigo. O processamento alternativo de RNA mensageiro é reconhecidamente importante na regulação da expressão gênica. A relação deste processo com doenças autoimunes foi revisado por Evsyukova *et al.*

(2011) que concluíram que a alteração do padrão de processamento alternativo pode ser um fator de extrema relevância na patogênese de doenças autoimunes. A evidência de expressão diferencial de um dos RNAm de *CD1D* entre pacientes de PF e controles demonstrada no presente trabalho, ainda que necessite de experimentos complementares para conclusões mais precisas, destaca um novo enfoque na investigação da patogênese do pênfigo e corrobora a importância do processamento alternativo em doenças autoimunes.

6 CONCLUSÃO

Em monócitos, o RNAm de *CD1d* foi encontrado significativamente subexpresso em pacientes com pênfigo foliáceo. Já em células B IgG⁺ e IgG⁻ não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no nível de RNAm de *CD1D* entre pacientes e controles. Além disso, em uma análise quantitativa, o RNAm de *CD1D* representado pela banda 1C (que possui os éxons 3 e 4 completos) esteve menos frequente em pacientes do que em indivíduos sem a doença. Estes resultados indicam que a regulação transcricional e pós-transcricional pode estar alterada em pênfigo, pelo menos em alguns dos tipos celulares envolvidos na resposta imune. Este estudo sugere que *CD1D* pode desempenhar um papel na patogênese do pênfigo ou tem sua expressão alterada como resultado da doença. Além disso, antígenos glicolipídicos e células NKT podem estar implicados no desenvolvimento do PF. Estudos futuros devem esclarecer o possível significado funcional desses achados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSON D.G., FISHPOOL R., SHERRINGTON P., NACHEVA E., MILSTEIN C. Sensitive and high resolution in situ hybridization to human chromosomes using biotin labeled probes: Assignment of the human thymocyte CD1 antigen genes to chromosome 1. **EMBO Journal**, v.7, p.2801-2805, 1988.

ANASTASIADIS A., KOTSIANIDIS I., PAPADOPOULOS V., SPANOUDAKIS E., MARGARITIS D., CHRISTOFORIDOU A., GOULIAMTZI S., TSATALAS C. CD1d expression as a prognostic marker for chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia and Lymphoma**, 2013. Publicado online, disponível em: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2013.803222>

AOKI V., MILLIKA R.C., RIVITTI E.A., HANS-FILHO G., EATON D.P., WARREN S.J.P., LI N., HILARIO-VARGAS, J., HOFFMANN R.G., DIAZ L.A. Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 9, n. 1, p. 34-40, 2004.

BALK S.P., BLEICHER P.A., TERHORST C. Isolation and characterization of a cDNA and gene coding for a fourth CD1 molecule. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.86, p.252-256, 1989.

BARRAL D.C., BRENNER M.B. CD1 antigen presentation: How it works. **Nature reviews. Immunology**, v.7, p. 929–94, 2007.

BASTUJI-GARIN S., SOUISSI R., BLUM L., TURKI H., NOUIRA R., JOMAA B., ZAHAF A., BEN OSMAN A., MOKHTAR I., FAZAA B. Comparative epidemiology of pemphigus in Tunisia and France: unusual incidence of pemphigus foliaceus in young Tunisian women. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 104, n. 2, p. 302-305, 1995.

BENAM K.H., KOK W.L., McMICHEL A.J., HO L-P. Alternative Spliced *CD1D* Transcripts in Human Bronchial Epithelial Cells. **PLoS ONE**, 6(8): e22726. doi:10.1371/journal.pone.0022726, 2011.

BONISH B., JULLIEN D., DUTRONC Y., HUANG B.B., MODLIN R., SPADA F.M., PORCELLI S.A., NICKOLOFF B.J. Overexpression of *CD1D* by keratinocytes in psoriasis and *CD1D*-Dependent IFN- γ Production by NK-T Cells. **Journal of Immunology**, v.165, p. 4076–4085, 2000.

Brenner S e Wolf R. Possible nutritional factors in induced pemphigus. **Dermatology**, v.189, p. 337-339. 1994.

BRAUN-PRADO K., PETZL-ERLER M. L. Programmed cell death 1 gene (PDCD1) polymorphism and pemphigus foliaceus (fogo selvagem) disease susceptibility. **Genetics Molecular Biology**, v. 30, p. 314, 2007.

BRIGL M., BRENNER M.B. CD1: Antigen presentation and T cell function. **Annual Review of Immunology**, v.22, p.817–890, 2004.

CAMPBELL I., REIS V., AOKI V., CUNHA P., HANS FILHO G., ALVES G., ROCHA R., FRIEDMAN H. Pênfigo foliáceo endêmico/fogo selvagem. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.76, p.13-33, 2001.

CANCHIS P.W., BHAN A.K., LANDAU S.B., YANG L., BALK S.P., BLUMBERG R.S. Tissue distribution of the non-polymorphic major histocompatibility complex class I-like molecule, CD1d. **Immunology**, V.80, P. 561-565, 1993.

CAPORALE C.M.,PAPOLA F., FIORONI M.A., AURELI A., GIOVANNINI A., NOTTURNO F., ADORNO D., CAPORALE V., UNCINI A. Susceptibility to Guillain–Barré syndrome is associated to polymorphisms of CD1 genes. **Journal of Neuroimmunology**, v.177, p.112–118, 2006.

DALLA-COSTA R., PINCERATI M.R., BELTRAME M. H., MALHEIROS D., PETZL-ERLER M. L. Polymorphisms in the 2q33 and 3q21 chromosome regions including Tcell coreceptor and ligand genes may influence susceptibility to pemphigus foliaceus. **Human Immunology**, v. 71, p. 809, 2010.

DIAZ L.A., SAMPAIO S.A.P., RIVITTI E.A., MARTINS C.R., CUNHA P.R., LOMBARDI C., ALMEIDA F.A., CASTRO R.M., MACCA M.L., LAVRADO C., HANS FILHO G., BORGES P., CHAUL A., MINELLI L., EMPINOTTI J.C., FRIEDMAN H., CAMPBELL I., LABBIB R.S., ANHALT G.J. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem): II. Currente and historical epidemiologic studies. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.92, p.4-12, 1989.

DMOCHOWSKI M., HASHIMOTO T., GARROD D.R., NISHIKAWA T. Desmocollins I and II are recognized by certain sera from patients with various types of Pemphigus particularly Brazilian Pemphigus foliaceus. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.100, p.380–384, 1993.

EATON D.P., HANS-FILHO G., SANTOS V.D., AOKI V., FRIEDMAN H., RIVITTI E.A., SAMPAIO S.A., GOTTLIEB M.S., GIUDICE G.J., LOPEZ A., CUPP E.W. Comparison of black fly species (Diptera: Simuliidae) on an Amerindian reservation with a high prevalence of fogo selvagem to neighboring disease-free sites in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. Journal of Medical Entomology**, v.35, p.120-131, 1998.

EVSYUKOVA I., SOMARELLI J. A., GREGORY S.G., GARCIA-BLANCO M. A. Alternative Splicing in Multiple Sclerosis and other autoimmune diseases. **RNA Biology**, v.7, p.462-473, 2011.

EXLEY M., GARCIA J., WILSON S.B., SPADA F., GERDES D., TAHIR S.M.A., PATTON K.T., BLUMBERG R.S, PORCELLI S., CHOTT A., BALK S.P. CD1d structure and regulation on human thymocytes, peripheral blood T cells, B cells and monocytes. **Immunology**, v.100, p. 37–47, 2000.

FALCONE M., FACCIOITI F., GHIDOLI N., MONTI P., OLIVIERI S., ZACCAGNINO L., et al. (2004) Up-regulation of CD1d expression restores the immunoregulatory function of NKT cells and prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. **Journal of Immunology**, v.172, p.5908–5916, 2004.

FRIEDMAN H.; CAMPBELL I.; ROCHA-ALVAREZ R.; FERRARI I.; COIMBRA C. E.; MORAES, J.R.; FLOWERS N.M.; STASTNY P.; FERNANDEZ-VIÑA M.; OLAGUE-ALCALA, M. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in native Americans from Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 32, n. 6, p. 949-56, 1995.

GAN L-H., PAN Y-Q., XU D-P., LI M., LIN A., YAN W-H. Polymorphism of human CD1a, CD1d, and CD1e in exon 2 in Chinese Han and She ethnic populations. **Tissue Antigens**, v.75, p. 691- 695, 2010.

GODFREY D.I., KRONENBERG M. Going both ways: Immune regulation via CD1d dependent NKT cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v.114, p.1379–1388, 2004.

GOLMOGHADDAM H., PEZESHKI A.B., GHADERI A., DOROUDCHI M. CD1a and *CD1D* Genes Polymorphisms in Breast, Colorectal and Lung Cancers. **Pathology oncology research: POR**, v.3, p.669-675, 2011.

GRANT E.P., DEGANO M., ROSAT J.P., STENGER S., MODLIN R.L., WILSON I.A., PORCELLI S.A., BRENNER M.B. Molecular recognition of lipid antigens by T cell receptors. **Journal of Experimental Medicine**, v.189, p.195–205, 1999.

GUMPERZ JE, MIYAKE S, YAMAMURA T, BRENNER MB. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. **Journal of Experimental Medicine**, v.195, p.625–636. 2002.

HALE E.K. Pemphigus Foliaceus. **Dermatology Online Journal**, v.8, p.9. 2002

HAMMOND K.J., POULTON L.D., PALMISANO L.J., SILVEIRA P.A., GODFREY D.I., BAXTER A.G. Alpha/beta-T cell receptor (TCR) +CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. **The Journal of Experimental Medicine**, v.187, p.1047–1056. 1998.

HAN M., HANNICK L.I., DIBRINO M., ROBINSON M.A. Polymorphism of human CD1 genes. **Tissue Antigens**, v.54, p. 122–127,1999.

HANS-FILHO G., AOKI V., ROVITTI E., EATON D.P., LIN M.S., DIAZ L. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) -1998. **Clinics in Dermatology**, v.17, p.225-235, 1999.

JAMES K.A., CULTON D.A., DIAZ L.A. Diagnosis and Clinical features of Pemphigus Foliaceus. **Dermathologic Clinics**, v 29, p. 405-412, 2011.

JENKINSON H. J., WAINWRIGHT S. D., SIMPSON K. L., PERRY A. C. F., FOTIADOU P., HOLME C. H. Expression of *CD1D* mRNA transcripts in human chorioncarcinoma cell lines and placentally derived trophoblast cells. **Immunology**, v.96, p.649–655, 1999.

JONES J.C., ARNN J., STACHELIN L.A., GOLDMAN R.D. Human antibodies against desmosomes: possible causative factors in pemphigus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.81, p 2781-2785, 1984.

KIM S.C., CHUNG Y.L., KIM J., CHO N.J., AMAGAI M. Pemphigus vulgaris with autoantibodies to desmoplakin. **The British Journal of Dermatology**, v.145, p.838–840, 2001.

KINJO Y., KITANO N., KRONENBERG M. The role of invariant natural killer T cells in microbial immunity. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.19, p.560-570, 2013.

KOJO S., ADACHI Y., TSUTSUMI A., SUMIDA T. Alternative Splicing Forms of the Human *CD1D* Gene in Mononuclear Cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.276, p.107–111, 2000.

KOJO S., TSUTSUMI A., GOTO D., SUMIDA T. Low expression levels of soluble CD1d gene in patients with rheumatoid arthritis. **The Journal of Rheumatology**, v.30, 2524–2528, 2003.

KORMAN N.J., EYRE R.W., KLAUS-KOVTUN V., STANLEY J.R. Demonstration of an adhering-junction molecule (plakoglobin) in the autoantigens of Pemphigus foliaceus and Pemphigus vulgaris. **The New England Journal of Medicine**, v.321, p. 631–635, 1989.

LI N., AOKI V., HANS-FILHO G., RIVITTI E A., DIAZ L. A. The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem). **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, p. 1501-1510, 2003.

LIN M.S., FU C.L., AOKI V., HANS-FILHO G., RIVITTI E.A., MORAES J.R., MORAES M.E., LAZARO A.M., GIUDICE G.J., STASTNY P., DIAZ L.A. Desmoglein-1-specific T lymphocytes from patients with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **The Journal of clinical investigation**, v.105, p.207-213, 2000.

LOMBARDI C., BORGES P.C., CHAUL A., SAMPAIO S.A.P., RIVITTI E.A., FREIDMAN H., MARTINS C.R., SANCHES J.A., CUNHA P.R., HOFFMANN R.G., Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (Fogo selvagem). "The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research". **The Journal of Investigative Dermatology**, v.98, p.847-850, 1992.

MALHEIROS D. Análise do perfil de expressão gênica de linfócitos CD4+ aplicada ao estudo da doença autoimune pênfigo foliáceo endêmico. Curitiba, 2009. 106p. **Tese** (Doutorado em Genética). Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Orientadora: Maria Luiza Petzl-Erler.

MALHEIROS D., PETZL-ERLER, M. L. Individual and epistatic effects of genetic polymorphisms of B-cell co-stimulatory molecules on susceptibility to pemphigus foliaceus. **Genes Immunology**, v. 10, p. 547, 2009.

MARTEL M., JOLY P. Pemphigus: autoimmune diseases of keratinocyte's adhesion molecules. **Clinics in Dermatology**, v.19, p.662-674, 2001.

MATSUDA J.L., MALLEVAEY T., SCOTT-BROWNE J., GAPIN L. CD1d-restricted iNKT cells, the "Swiss-Army knife" of the immune system. **Current Opinion in Immunology**, v.20. p.358-368, 2008.

NGUYEN V.T., LEE T.X., NDOYE A., SHULTZ L.D., PITTELKOW M.R., DAHL M.V., LYNCH P.J., GRANDO S.A. The pathophysiological significance of non-desmoglein targets

of Pemphigus autoimmunity. Pemphigus vulgaris and foliaceus patients develop antibodies against keratinocyte cholinergic receptors. **Archives of Dermatology**, v.134, p.971–980, 1998

OTTAVIANI C., NASORRI F., BEDINI C., DE PITA O., GIROLOMONI G., CAVANI A. CD56brightCD16(-) NK cells accumulate in psoriatic skin in response to CXCL10 and CCL5 and exacerbate skin inflammation. **European Journal of Immunology**, v.36, p.118–128, 2006.

PARK S-H., BENDELAC A. CD1-restricted T-cell responses and microbial infection. **Nature**, v.406, p.788-792, 2000.

PAVONI D.P., ROXO V.M.M.S., MARQUART FILHO A., PETZL-ERLER M.L. Dissecting the associations of endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. **Genes and Immunity**, v. 4, n. 2, p. 110-6, 2003.

PEREIRA N. F., HANSEN J. A., LIN M. T., ROXO V. M., BRAUN K., PETZL-ERLER M. L. Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for IL6 variants. **Cytokine**, v. 28, p. 233, 2004.

PETZL-ERLER M.L., SANTAMARIA J. Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? **Tissue Antigens**, v.33, p.408-414, 1989.

PIOVEZAN B.Z., PETZL-ERLER M.L. Both Qualitative and quantitative genetic variation of MHC Class II molecules may influence susceptibility to autoimmune diseases: the case of endemic pemphigus foliaceus. **Human Immunology**, v.74, p.1134-1140, 2013

PORCELLI S.A., YOCKEY C.E., BRENNER M.B., BALK S.P. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. **The Journal of experimental medicine**, v.178, p. 1-16, 1993.

PORCELLI S.A., MODLIN R.L. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. **Annual Review of Immunology**, v.17, p.297–329, 1999.

QIAN Y., JEONG J.S., MALDONADO M., VALENZUELA J.G., *et al.* Cutting Edge: Brazilian Pemphigus Foliaceus Anti-Desmoglein 1 autoantibodies cross-react with sandy fly salivary LJM11 antigen. **The Journal of Immunology**; v.189, p.1535-1539, 2013.

RHOST S., SEDIMBI S., KADRI N., CARDELL S.L. Immunomodulatory type II Natural Killer T lymphocytes in Health and Disease. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 76, p. 246-255, 2012.

ROBLEDO, M.A., STEMA PRADA C., JARAMILLO D., LEON W. South American pemphigus foliaceus: Study of an epidemic in El Bagre and Nechi, Colombia 1982 to 1986. **British Journal of Dermatology**, v. 118, n. 6, p. 737-744, 1988.

SCHIEFNER A., WILSON I.A. Presentation of lipids antigens by CD1 glycoproteins. **Current Pharmaceutical Design**, v.15, p. 3311-3317, 2009.

SEGAWA S., GOTO D., YOSHIGA Y., HAYASHY T., MATSUMOTO I., ITO S., SUMIDA T. Low levels of soluble *CD1D* protein alters NKT cell function in patients with rheumatoid arthritis. **International Journal of Molecular Medicine**, v.24, p. 482-486, 2009.

TRON F., GILBERT D., MOUQUET H., JOLY P., DROUOT L., MAKNI S., MASMOUDI H., CHARRON D., ZITOUNI M., LOISEAU P., AYED M.B. Genetic factors in pemphigus. **Journal of Autoimmunity**, v.24, p.319-328, 2005.

TSUNNEYAMA K., YASOSHIMA M., HARADA K., HIRAMATSU K., GERSHWIN M.E., NAKANUMA Y. Increased *CD1D* Expression on Small Bile Duct Epithelium and Epithelioid Granuloma in Livers in Primary Biliary Cirrhosis. **Hepatology**, v.28, p.620-623, 1998.

TUR E., BRENNER S. Diet and pemphigus- in pursuit of exogenous factors in pemphigus and fogo selvagem. **Archives of Dermatology**, v.134, p. 1406-1410, 1998.

UDEY M.C., STANLEY J.R. Pemphigus – diseases of antidesmosomal autoimmunity. **JAMA**, v.282, p.572–576, 1999.

ULANOVA M., TOREBRING M., PORCELLI S.A., BENGTSSON U., MAGNUSSON J., MAGNUSSON O., LIN X.P., HANSON L.A., TELEMO E. Expression of *CD1D* in the Duodenum of Patients with Cow's Milk Hypersensitivity. **Scandinavian journal of immunology**, v.52, p. 609-617, 2000.

VAN DER VLIET H.J., VON BLOMBERG B.M., NISHI N., REIJM M., VOSKUYL A.E., VAN BODEGRAVEN A.A., et al. Circulating V α 24+ V β 11+ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage. **Clinical Immunology**, v.100, p.144–8, 2001.

VAN KER L. Regulation of immune responses by CD1d-Restricted Natural Killer T cells. **Immunologic Research**, v.30, p.139–153, 2004

WARREN S.J.P., LIN M.S., GIUDICE G.J., HOFFMANN R.G., HANS-FILHO G., AOKI V., RIVITTI E.A., SANTOS V., DIAZ L.A. The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. **The New England Journal of Medicine**, v.343, p.23-30, 2000.

WHEELER G.N., PARKER A.E., THOMAS C.L., ATALIOTIS P., POYNTER D., ARNEMANN J., RUTMAN A.F., PIDSLEY S.C., WATT F.M., REES D.A., BUXTON R.S., MAGEE A.I. Desmosomal glycoprotein DG1, a component of intercellular desmosome junctions, is related to the cadherin family of cell adhesion molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.88, 0.4796-4800, 1991.

WU H., WANG Z.H., YAN A., LYLE S., FAKHARZADEH S., WAHL J.K., WHELOCK M.J., ISHIKAWA H., UITTO J., AMAGAI M., STANLEY J.R. Protection against pemphigus foliaceus by desmoglein 3 in neonates. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 1, p. 31-5, 2000.

ZENG Z-H., CASTANO A.R., SEGELKE B.W., STURA E.A., PETERSON P.A., WILSON I.A. Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. **Science**, v.277, p. 339–345, 1997.

ZENG D, LIU Y, SIDOBRE S, KRONENBERG M, STROBER S. Activation of natural killer T cells in NZB/W mice induces Th1-type immune responses exacerbating lupus. **The journal of Clinical Investigation**, v. 112, p.1211–1222, 2003.

APÊNDICE

MATERIAIS E MÉTODOS COMPLEMENTARES

Caracterização da amostra

Para a análise dos RNAs mensageiros, os pacientes foram classificados quanto à presença de lesões e quanto à presença de tratamento no momento da coleta, de forma que são considerados os seguintes subgrupos: PF com lesão ativa sob tratamento imunossupressor (PF/LAT), pacientes de PF sem lesão sob tratamento imunossupressor (PF/SLT). Cada subgrupo de pacientes e o grupo indivíduos controle é composto de no mínimo 5 indivíduos, dos quais foram coletadas amostras de 50 ml de sangue periférico para separação celular, seguida de extração de RNA e análise de RNAs mensageiros de *CD1D*. Segue na tabela 1 a informação da amostra utilizada para a análise de RNAm de *CD1D*.

Tabela 1 - Caracterização da amostra para análise de RNA mensageiro de *CD1D*

Código do Indivíduo	Sexo	Idade	Estado das lesões	Tipos celulares
P111	F	38	PF/LAT	B IgG+, B IgG-, monócitos
P348	M	47	PF/LAT	B IgG+, B IgG-
P349	F	31	PF/LAT	B IgG+, B IgG-
P351	M	32	PF/LAT	B IgG+, B IgG-, monócitos
P353	M	66	PF/LAT	B IgG+, B IgG-
P358	F	50	PF/LAT	B IgG+, B IgG-
P359	F	25	PF/LAT	B IgG+, B IgG-
P285	F	31	PF/LAT	monócitos
P296	F	53	PF/LAT	B IgG+, B IgG-, monócitos
P362	F	52	PF/LAT	monócitos

P363	F	12	PF/LAT	monócitos
P367	M	22	PF/LAT	monócitos
P370	F	48	PF/LAT	B IgG+,B IgG-, monócitos
PK236	F	41	PF/SLT	B IgG+,B IgG-
P266	F	27	PF/SLT	B IgG+,B IgG-
P298	M	21	PF/SLT	B IgG+,B IgG-, monócitos
P338	F	66	PF/SLT	B IgG+,B IgG-, monócitos
P350	F	31	PF/SLT	B IgG+,B IgG-
P352	M	14	PF/SLT	B IgG+,B IgG-
P364			PF/SLT	monócitos
P366	F	31	PF/SLT	monócitos
P369	F	40	PF/SLT	monócitos
C630	F	70	CTR	B IgG+,B IgG-
C664	M	29	CTR	B IgG+,B IgG-
C687	M	45	CTR	B IgG+,B IgG-
43	F	58	CTR	B IgG+,B IgG-
369	M	24	CTR	B IgG+,B IgG-
331	F	30	CTR	monócitos
419	F	24	CTR	B IgG+,B IgG- monócitos
420	F	20	CTR	monócitos
423	F	20	CTR	monócitos
099	F	40	CTR	monócitos
467	M	19	CTR	monócitos
468	M	21	CTR	monócitos
410	M	43	CTR	monócitos
453	F	28	CTR	monócitos

As coletas de sangue periférico foram realizadas no Hospital Adventista do Pênfigo (HAP) em Campo Grande (MS) (n=19), no Hospital do Fogo Selvagem Lar da Caridade (Uberaba, MG) (n=3). Foram incluídos no estudo pacientes diagnosticados com base em dados clínicos e imunohistoquímicos, que não possuíam outra doença autoimune e que não

fossem consanguíneos de outro paciente ou controle da amostra. A amostra de pacientes é parcialmente sobreposta entre os tipos celulares, de modo que nem todos os indivíduos foram avaliados em todos os tipos de células. Todos os participantes deste estudo foram esclarecidos sobre o objetivo do mesmo e assinaram um termo de consentimento para participação da pesquisa (anexo I).

Obtenção dos tipos celulares: monócitos (CD14+), células B (CD19+) IgG+, células B (CD19+) IgG-

O método utilizado para obtenção dos tipos celulares foi a separação por esferas magnéticas (*microbeads*) acopladas ao anticorpo específico para cada tipo celular. A partir de 50 ml de sangue, foram realizados dois protocolos de separação celular, um deles, realizado com 10 ml de sangue, para obtenção de monócitos (CD14+) e o outro, do qual se obtém células B IgG+ e células B IgG-, foi realizado com os 40 ml de sangue restantes (protocolos de separação celular no anexo II). Ambos os protocolos iniciam com o isolamento da fração de células mononucleares (PBMC) por centrifugação com barreira de densidade de ficoll-hypaque $d=1,077$. As células são lavadas e ressuspensas em PBS contendo 0,5% de soro bovino fetal (SBF) e 2 mM de citrato de sódio, seguindo-se então à purificação dos tipos celulares através de kits de separação por esferas magnéticas (Milty Biotec). A pureza das subpopulações celulares obtidas foi determinada por citometria de fluxo no aparelho FACSVerse (BD Biosciences), a partir de alíquotas marcadas com anticorpos monoclonais específicos após cada separação.

Extração de RNA das células B IgG+, células B IgG- E dos monócitos

A extração de RNA das células B IgG+, B IgG- e monócitos foi realizada com o *mirVana™ miRNA Isolation kit* (Ambion, Austin, TX, USA), de acordo com as condições estabelecidas pelo fabricante. Com este kit é possível obter frações distintas de microRNA e de RNA mensageiro, o que é imprescindível uma vez que essa mesma amostra de células foi analisada em outro estudo realizado em nosso grupo de pesquisa, o qual requer microRNA (CIPOLLA *et al.*, trabalho em andamento).

Análise dos RNAs mensageiros de CD1D

Primeiramente foi realizada a transcrição reversa do RNA mensageiro de *CD1D*, com o *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems), segundo as instruções do fabricante. O cDNA formado foi submetido a reações em cadeia da polimerase (PCR) com 2

diferentes pares de *primers* (BENAM *et al.*, 2011) (Tabela 2) para detecção das variantes de RNAm de *CD1D* presentes em cada tipo celular. As reações continham 2 µl de tampão 1x; 2 µM de MgCl₂; 0,5 µM do *primers forward e reverse*; 0,2 µM de DNTPs; 0,1 u/µl de Taq DNA Polimerase Platinum e 2 µl de cDNA, totalizando 20 µl de volume final. As condições de termociclagem compreenderam uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos intercalados com hibridação a 58° ou 54°C (para os primers C e D respectivamente) por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Para finalizar uma extensão por 1 minuto a 72°C.

Tabela 2	Primer	Sequência
	<i>CD1D</i> _For. C	5'CTGCTGTTTCTGCTGCTCTG 3'
	<i>CD1D</i> _Rev. C	5'GACTCAAGGAGGCCACTGAC 3'
	<i>CD1D</i> _For. D	5'CTGGGAACGCCTCAAATAAC 3'
	<i>CD1D</i> _Rev. D	5'ACAGGACGCCCTGATAGGA 3'

O par de *primers CD1D D* é o mais abrangente e cobre desde parte do éxon 4 até o início do éxon 7. Já o par de *primers CD1D C* cobre parte do éxon 2 até o éxon 4 (Figura 1). Utilizando esses *primers* conseguimos inferir quais variantes de RNAm de *CD1D* estão presentes em cada tipo celular. Os produtos das PCRs foram submetidos a corridas eletroforéticas e, através da análise do tamanho dos fragmentos observados, detectamos as variantes expressas nas células de pacientes e controles.

RNA_m de *CD1D*

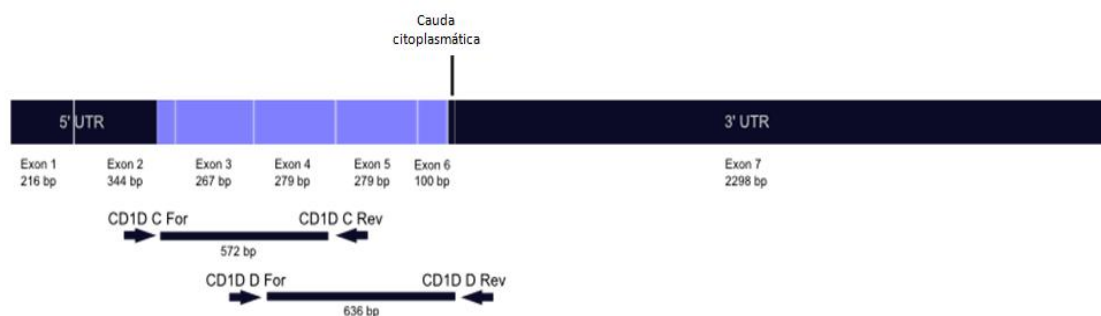


Figura 1. Representação esquemática do RNA_m completo de *CD1D*. As setas indicam as regiões onde os *primers* hibridam. As caixas representam os éxons e as linhas delimitam a região amplificada por cada par de *primers*. 5'UTR: região 5' não traduzida. 3'UTR: região 3' não traduzida. Fonte: a autora.

Para confirmar que o resultado visto na eletroforese correspondia às variantes de RNA_m de *CD1D*, as bandas visualizadas foram extraídas do gel de agarose com o uso do *Axyprep DNA gel isolation kit* (Axygen, USA) e sequenciadas no aparelho 3500 ABI, usando o BigDye Termination kit.

Quantificação do RNA_m de CD1D (qPCR)

As reações de PCR-RT foram realizadas pelo método *TaqMan*, no aparelho Mastercycler Ep Realplex (Eppendorf, Alemanha). Utilizou-se 5 µl do reagente específico *TaqMan Master Mix* (Applied Biosystems), 0,5 µl da sonda específica para *CD1D* *TaqMan* (Hs00939888-m1, Applied Biosystems), 2,5 µl de H₂O, e 2 µl de cDNA. As condições de termociclagem compreenderam uma incubação a 50°C por 2 minutos, seguidas pela ativação da DNA polimerase a 95°C por 10 minutos, e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos intercalados com hibridação e extensão a 60°C por 1 minuto. As reações foram preparadas em duplicatas, num volume final de 10 µl. Para normalização das concentrações de RNA_m foi utilizada a sonda para o gene de referência GUSB (Hs00939627_m1, Applied Biosystems).

RESULTADOS COMPLEMENTARES

Quantificação do RNAm de CD1D

Análises adicionais foram realizadas com os dados obtidos na qPCR de *CD1D*. Primeiramente, excluimos da análise o maior e menor valor de *fold* (que representa a diferença de expressão) obtido com a estatística $2^{-\Delta\Delta C_q}$, eliminando assim possíveis *outliers*. Os resultados dessa nova análise mantiveram significativas as diferenças encontradas para monócitos. Foi corroborada a existência de tendência a significância em comparações com as células B, principalmente para células B IgG-, para as quais algumas comparações passaram a ter um valor de *P* significativo, ou mais próximo do limiar de significância (tabela 3 e figura 2).

Tabela 3. Comparação da quantificação de *CD1D* nos subgrupos de pacientes e controles, sem valores extremos

Tipo Celular	CTR x aPF		CTR x iPF		aPF x iPF		CTR x PF	
	DE	P	DE	P	DE	P	DE	P
B IgG+	1,93	0,2500	1,08	0,7000	0,56	0,6786	1,84	0,3217
B IgG-	5,28	0,0357	5,31	0,0571	1,33	0,6825	5,28	0,0110
Monócitos	0,44	0,0140	0,30	0,0167	0,68	0,0952	0,42	0,0012

CTR: controles. aPF: Pacientes com lesão ativa. iPF: Pacientes sem lesão. *P*: Probabilidade.

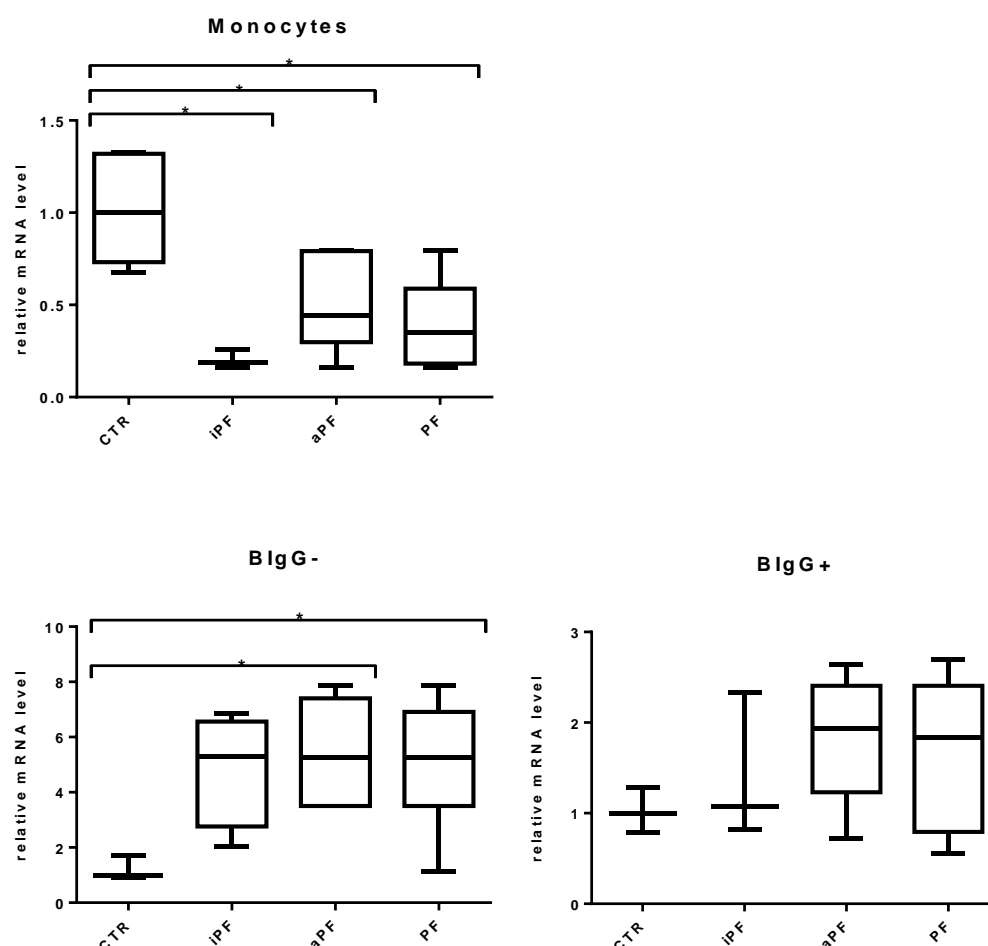
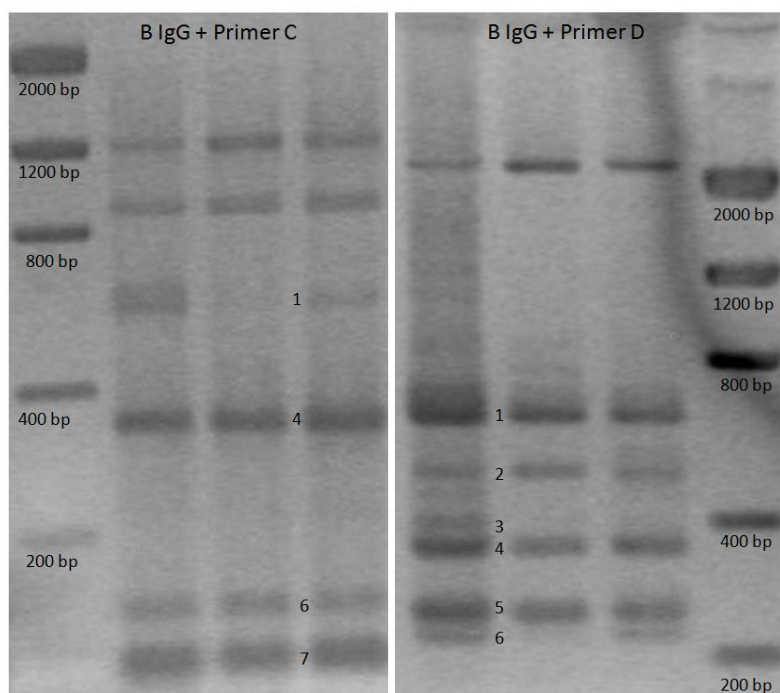


Figura 2: Níveis relativos de RNAm de *CD1D* obtidos por qRT-PCR (análise sem valores extremos). A: Monócitos B: Células B IgG-, C: células B IgG+. CTR: controles sem a doença. iPF: Pacientes sem lesão. aPF: pacientes com lesão ativa. PF: iPF unido à aPF. Dados são mostrados como um box-plot, onde a barra dentro da caixa representa a mediana, as

linhas fora da caixa representam os percentis 25 e 75, as barras fora das caixas representam os valores de distribuição mínimos e máximos. *indica diferenças estatisticamente significantes.

Variantes de RNAm de CD1D

A quantidade de bandas visualizadas após a amplificação com os pares de primers C e D variou entre os tipos celulares analisados. Para as células B IgG+ visualizamos as bandas 1, 4, 6 e 7, utilizando o par de primers C. Já com o par D visualizamos as bandas 1, 2, 3, 4, 5 e 6. As células B IgG- apresentaram todas as 7 bandas visualizadas com o primer C. Utilizando o primer D estiveram presentes nessas células as bandas 1, 2, 3, 5 e 6. Para os monócitos detectamos as bandas de 1 a 7 com o primer C, e com o D as bandas de 1 a 6. A figura 3 exemplifica as bandas visualizadas em cada tipo celular.



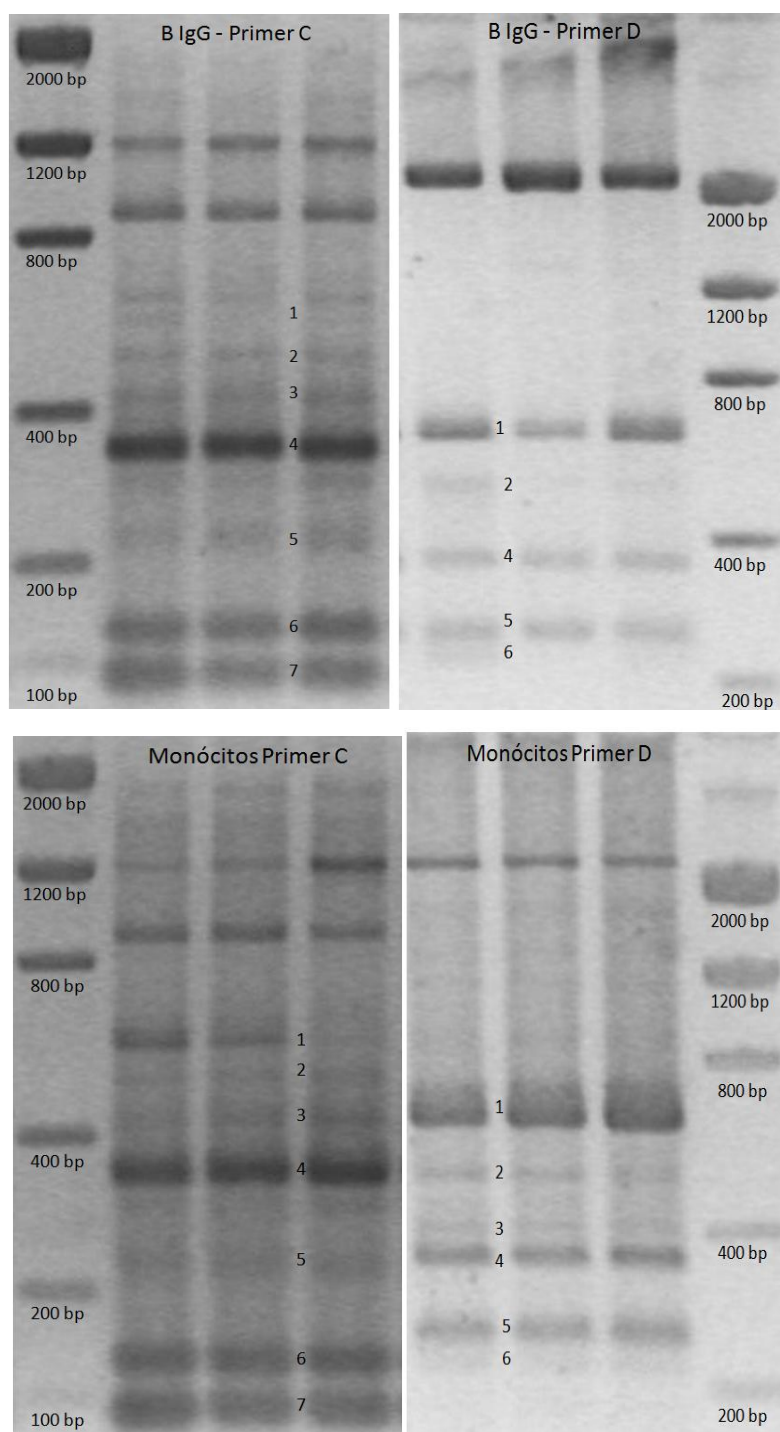


Figura 3: Fotos das eletroforeses com o resultado da amplificação com os primers C e D. As bandas estão numeradas de acordo com o tamanho em pares de bases, da maior para a menor. Apenas bandas com tamanho igual ou maior que os fragmentos totais amplificados com os primers C (572pb/banda 1C) e primers D (636pb/banda 1D), foram consideradas.

Citometria de Fluxo

Após a separação celular por esferas magnéticas, alíquotas das soluções celulares enriquecidas em monócitos foram avaliadas por citometria de fluxo para verificar a eficiência do processo de separação. A figura 4 mostra um exemplo representativo do enriquecimento em monócitos (CD14+).

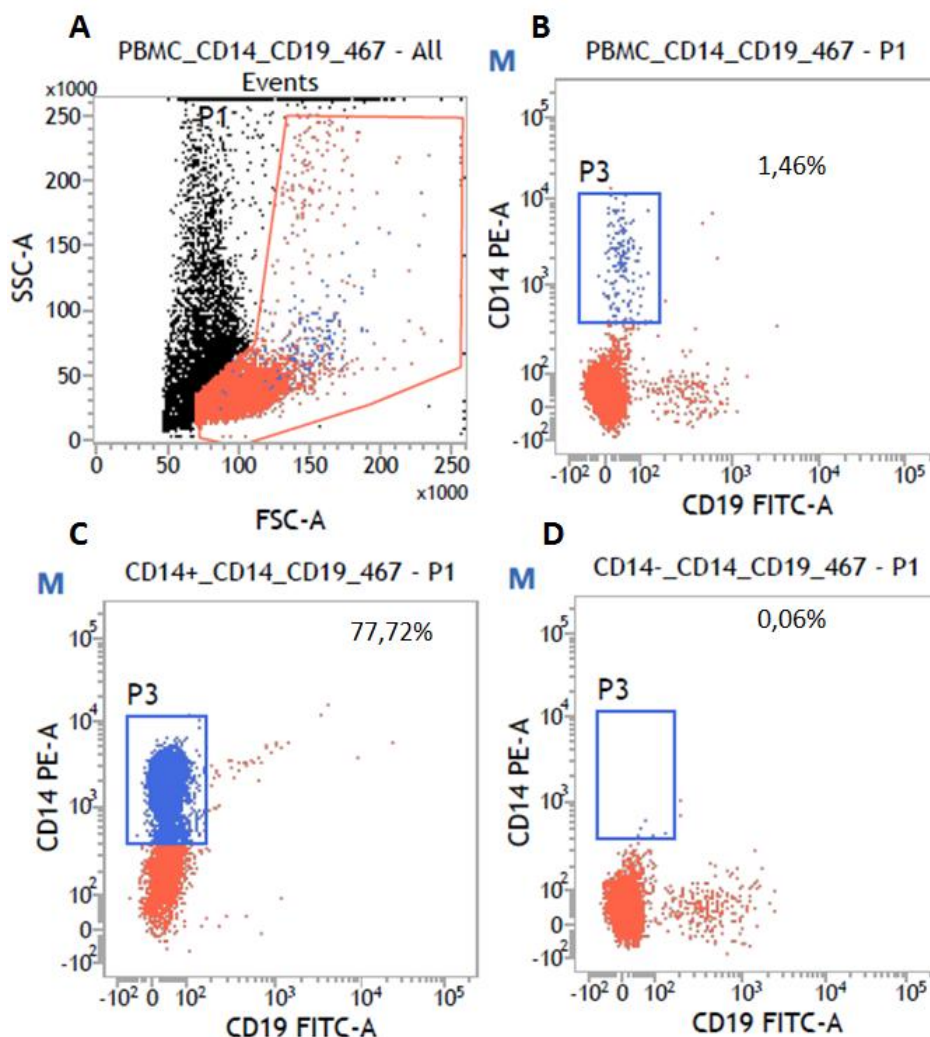


Figura 4 - Imunofenotipagem de citometria de fluxo para avaliação do enriquecimento de monócitos (CD14+) após separação celular magnética. (A) População de PBMC caracterizados de acordo com seu tamanho e granulosidade. (B) População de PBMC marcada com os anticorpos anti-CD14 PE e anti-CD19 FITC. (C) População de células CD14+ marcadas com CD14 PE e CD19 FITC, mostrando o enriquecimento para monócitos. (D) População de células CD14- marcadas com CD14 PE e CD19 FITC, mostrando a quase total ausência de monócitos. FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO DOS ASPECTOS GENÉTICOS E IMUNOLÓGICOS DO PÊNFIGO

Este é um convite para você participar voluntariamente do projeto de pesquisa GENES E SUAS VARIAÇÕES: ANÁLISE MOLECULAR, EVOLUTIVA E FUNCIONAL, EM POPULAÇÕES E EM DOENÇAS. Por favor, leia com atenção as informações abaixo antes de dar ou não seu consentimento para participar deste estudo. Se houver qualquer dúvida sobre o estudo ou sobre este documento, pergunte ao pesquisador com quem você está conversando neste momento.

□ OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo desse estudo é conhecer porque certas pessoas contraem o pênfigo enquanto outras aparentemente são resistentes ao desenvolvimento dessa doença. A predisposição ao pênfigo depende de vários fatores. Alguns desses fatores são do ambiente no qual a pessoa vive e de seus hábitos alimentares ou medicamentos. Outros são genéticos, hereditários. Entretanto, os fatores de predisposição ainda são pouco conhecidos. Esse trabalho de pesquisa científica vai esclarecer quais são os genes diferencialmente expressos e também quais as interações celulares envolvidas na patogênese da doença. Esse estudo permite identificar fatores que tornam a pessoa mais, ou menos, predisposta à doença. O resultado poderá auxiliar para a prevenção, tratamento e cura da doença, no futuro.

PROCEDIMENTOS

Se você participar deste estudo, serão colhidas uma amostra de seu sangue (cerca de 50 ml, ou seja, correspondente ao volume de um copo de cafezinho) e/ou uma amostra da pele, do mesmo tipo que é colhida para os exames de laboratório solicitados pelo seu médico. Essa amostra de pele (biópsia) será obtida pelos médicos responsáveis. A amostra de sangue será dividida em três lotes que servirão para a obtenção de DNA (10 ml), de RNA (15 ml) e de células mononucleares (PBMC) (25 ml). Você também irá responder a algumas perguntas sobre a sua origem e a origem de seus ancestrais, assim como sobre os seus hábitos e condições de vida.

RISCOS

Não há riscos previstos na execução do estudo, sendo que os únicos desconfortos poderão ser a coleta da amostra de sangue e da biópsia de pele.

BENEFÍCIOS

Não há nenhum benefício direto desta pesquisa para você. Porém, o conhecimento adquirido através deste estudo poderá auxiliar na compreensão das causas da doença. Isso poderá contribuir para o desenvolvimento de métodos mais eficientes de prevenção e tratamento, com menos efeitos indesejados.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

A sua participação neste estudo é *voluntária*. Mesmo que você decida participar, terá plena e total liberdade para desistir do estudo a qualquer momento, sem que isso acarrete qualquer prejuízo para você. Embora não seja esperado, caso você tenha algum problema e não possa ir ao trabalho, você receberá um atestado médico para justificar a sua falta.

ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras biológicas serão armazenadas no Biorrepositório de Amostras do Laboratório de Genética Molecular Humana, na Universidade Federal do Paraná, por um período de cinco anos e, caso necessário, este período será prorrogado após a aprovação por parte do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e o material poderá permanecer armazenado para pesquisas futuras se em conformidade com as normas do CNS (Art. 1º-12 da RESOLUÇÃO CNS Nº 441, DE 12 DE MAIO DE 2011).

ESCLARECIMENTO DE DÚVIDAS

Você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias antes de concordar em participar do estudo.

GARANTIA DE SIGILO E PRIVACIDADE

A sua identificação será mantida confidencial. Os resultados do estudo serão publicados sem revelar a sua identidade.

EQUIPE DE PESQUISADORES

Os pesquisadores envolvidos nesse projeto são:

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Maria Luiza Petzl-Erlar - Departamento de Genética, UFPR.

Colaboradores: Dra. Luiza Guilherme Guglielmi (USP - SP); Dra. Ana Maria Roselino e Dr. Marco Antônio Zago (FMRP-USP); Dr. Alfredo Marquardt Filho (Hospital Adventista do Pênfigo); Dra. Noemi Farah Pereira (Hospital de Clínicas, UFPR); Dra. Luiza Tamie Tsuneto (UEM); Dr. Eduardo Rocha Amazonas de Almeida (UFPR), Dra. Márcia Holsbach Beltrame (UFPR), Dr. Danillo Gardenal Augusto, Dra. Danielle Malheiros Ferreira (UP), Dra. Karin Braun-Prado (UFPR); Alunos do Programa de Pós-Graduação em Genética da UFPR: Reginaldo Vieira de Sene, Liana Alves de Oliveira e Sara Cristina Lobo Alves e Gabriel

Adelman Cipolla; Alunos de graduação da UFPR: Sheyla Mayumi Kuniwake, Eleonora Paulini, Pedro Cruz, Simone Lenis Fachin.

Número de telefones: (+41) 3361-1746 e 3361-1724 (+41) 9741-9969 (Dr. Eduardo Amazonas de Almeida)

Diante do exposto acima eu, _____ abaixo assinado, declaro que fui esclarecido sobre os objetivos do presente estudo, sobre os desconfortos que poderei sofrer, assim como sobre os benefícios que poderão dele resultar. Concedo meu acordo de participação de livre e espontânea vontade. Foi-me assegurado o direito de abandonar o estudo a qualquer momento, se eu assim o desejar. Declaro também não possuir nenhum grau de dependência profissional ou educacional com os pesquisadores envolvidos nesse projeto (ou seja os pesquisadores desse projeto não podem me prejudicar de modo algum no trabalho ou nos estudos), não me sentindo pressionado de nenhum modo a participar dessa pesquisa.

_____, ____ de _____ de _____
local data

Assinaturas

_____ Voluntário	_____ Pesquisador
RG	RG

Este Termo de Consentimento foi revisado pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da UFPR.

ANEXO II

PROTOCOLO COMPLETO DE SEPARAÇÃO CELULAR COM *BEADS* MAGNÉTICOS – UTILIZADO PARA CÉLULAS B IgG+ E B IgG-.

Obtenção de PBMC e Remoção de Células Mortas:

- 1) Transferir o sangue para um tubo falcon;
- 2) Adicionar 2 a 4 vezes de PBS 1X ao volume de sangue (para 40mL de sangue, 100mL de PBS 1X);
- 3) Homogeneizar bem;
- 4) Adicionar a solução de sangue + PBS lentamente e com muito cuidado sobre a solução de Ficoll aliqotada em tubo falcon (para cada 140mL de solução, 40mL de Ficoll);
- 5) Centrifugar por 30 min a 2000 rpm (corresponde aproximadamente a 400 xg);

Obs.: centrifugação a temperatura ambiente e com freios desligados.

- 6) Retirar a fase correspondente ao plasma diluído a partir da superfície, parando cerca de 0,5 cm antes do anel de PBMC;
- 7) Retirar a fase com plasma diluído (0,5cm) + anel de PBMC com cuidado para não pegar hemácias, transferindo a fase para um tubo falcon novo de 50mL;
- 8) Lavar com **solução de enxágue MACS**, completando até 50mL e homogeneizar bem;
- 9) Centrifugar por 10 min a 1400 rpm (corresponde aproximadamente a 200 xg) para remoção de plaquetas;

Obs.: a partir daqui, refrigerar centrífuga entre 4 e 8°C e religar freios;

- 10) Aspirar sobrenadante e ressuspender *pellet* em volume pequeno de PBS 1X;
- 11) Ressuspender em 30mL de PBS 1X e retirar uma alíquota para **contagem** (50µL), uma para **verificação de viabilidade** (100µL) e 300 mil células para **verificação de pureza no citômetro**;
- 12) Completar logo em seguida até 50mL para finalizar 2ª lavagem;
- 13) Centrifugar por 10 min a 1700 rpm (corresponde aproximadamente a 300 xg);
- 14) Aspirar sobrenadante e retirar o que restar com auxílio de micropipeta com cuidado para não aspirar células;
- 15) Ressuspender *pellet* em 100µL de beads magnéticos para remoção de células mortas para cada 10⁷ células;
- 16) Homogeneizar bem;

- 17) Incubar a temperatura ambiente por 15 min;
- 18) Lavar com 1 a 10mL de **tampão de ligação 1X** para cada 10^7 células;

Obs.: tampão de ligação 1X preparado em condições estéreis a partir da solução estoque do tampão de ligação 20X.

- 19) Posicionar a coluna no magneto;
- 20) Hidratar a coluna com 3mL de tampão de ligação 1X;
- 21) Assim que parar de gotejar, aplicar a amostra na coluna;
- 22) Quando a amostra terminar de passar, lavar 4 vezes com 3mL de tampão de ligação 1X, sempre esperando parar de gotejar para iniciar nova lavagem;
- 22) Recuperar efluente (fração de células vivas) e retirar uma alíquota para **contagem** (50μL) e outra para **verificação de viabilidade** (100μL) (fator de diluição: 15mL);
- 23) Centrifugar por 5 min a 2500 rpm;
- 24) Aspirar sobrenadante.

SEPARAÇÃO CELULAR COM *BEADS* MAGNÉTICOS:

- 1) Ressuspender *pellet* em 80µL de **solução de enxágue MACS** para cada 10^7 células em tubo falcon de 14mL;
- 2) Adicionar 20µL de *beads* magnéticos CD4 MultiSort para cada 10^7 células;
- 3) Homogeneizar bem;
- 4) Incubar por 5 min entre 4 e 8°C (em gelo molhado ou geladeira);
- 5) Adicionar 20µL do reagente de bloqueio FcR e 10µL de anticorpo CD294(CRTH2)-PE para cada 10^7 células;
- 6) Homogeneizar bem;
- 7) Incubar por mais 10 min entre 4 e 8°C (em gelo molhado ou geladeira);
- 8) Lavar com 1 a 2mL de solução de enxágue MACS para cada 10^7 células;
- 9) Centrifugar por 5 min a 2500 rpm;
- 10) Aspirar sobrenadante e ressuspender até 2×10^8 células em 1mL de solução de enxágue MACS;

Obs.: cuidar para não formar bolhas, pois esta solução será usada na coluna. Se houver grumos de células, retirá-los. A capacidade das colunas LS é de até 2×10^9 células totais e de até 10^8 células positivas.

- 11) Posicionar a coluna no magneto;
- 12) Hidratar a coluna com 3mL de solução de enxágue MACS;
- 13) Assim que parar de gotejar, aplicar a amostra na coluna;
- 14) Quando a amostra terminar de passar, lavar 5 vezes com 3mL de solução de enxágue MACS, sempre esperando parar de gotejar para iniciar nova lavagem;
- 15) Para melhorar pureza, retirar cuidadosamente última gota fazendo uso do êmbolo;
- 16) Retirar a coluna do magneto e adicionar 5mL de solução de enxágue MACS;
- 17) Colocar o êmbolo e empurrar para retirar as células retidas na coluna, que são as células de interesse;

Obs.: antes de empurrar o êmbolo, deixar escorrer cerca de 1mL para que as células se soltem um pouco da coluna, diminuindo o estresse mecânico que poderia ativá-las.

- 18) Retirar o êmbolo, colocar mais 2mL de solução de enxágue MACS e empurrar novamente;
- 19) Retirar uma alíquota de 50µL para a **contagem** (fator de diluição: 7 mL), 200 mil células $CD4^+$ para **verificação de pureza da separação**.

São separadas 2×10^6 células CD4⁺ para extração de DNA/RNA para o projeto de análise de metilação e para análise dos RNA mensageiros de *CD1D*. O restante das células CD4⁺ sofrem outros processos de separação para obtenção de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ e Th2 CD4⁺CD294⁺ necessárias em outra pesquisa de nosso grupo.

20) Reservar (ou processar em paralelo) a fração negativa (CD4⁻) para obtenção de células B CD19⁺IgG de memória.

21) Centrifugar a fração negativa (CD4⁻) por 5 min a 2500 rpm;

22) Aspirar sobrenadante e ressuspender *pellet* em 80µL de solução de enxágue MACS para cada 10^7 células;

23) Adicionar 20µL de beads magnéticos CD19 MultiSort para cada 10^7 células;

24 Homogeneizar bem;

25) Incubar por 15 min entre 4 e 8°C (em gelo molhado ou geladeira);

26) Lavar com 1 a 2mL de solução de enxágue MACS para cada 10^7 células;

27) Centrifugar por 5 min a 2500 rpm;

28) Aspirar sobrenadante e ressuspender até 2×10^8 células em 1mL de solução de enxágue MACS;

Obs.: cuidar para não formar bolhas, pois esta solução será usada na coluna. Se houver grumos de células, retirá-los. A capacidade das colunas LS é de até 2×10^9 células totais e de até 10^8 células positivas.

29) Posicionar a coluna no magneto;

30) Hidratar a coluna com 3mL de solução de enxágue MACS;

31) Assim que parar de gotejar, aplicar a amostra na coluna;

32) Quando a amostra terminar de passar, lavar 5 vezes com 3mL de solução de enxágue MACS, sempre esperando parar de gotejar para iniciar nova lavagem;

33) Para melhorar pureza, retirar cuidadosamente última gota fazendo uso do êmbolo;

34) Retirar a coluna do magneto e adicionar 5mL de solução de enxágue MACS;

35) Colocar o êmbolo e empurrar para retirar as células retidas na coluna, que são as células de interesse;

Obs.: antes de empurrar o êmbolo, deixar escorrer cerca de 1mL para que as células se soltem um pouco da coluna, diminuindo o estresse mecânico que poderia ativá-las.

36) Retirar o êmbolo, colocar mais 2mL de solução de enxágue MACS e empurrar novamente;

- 37) Retirar uma alíquota de 50µL para a **contagem** (fator de diluição: 7 mL) e 200 mil células CD19⁺ para **verificação de pureza da separação**;
- 38) Congelar a -20°C a fração negativa (CD19⁻) para **extração de DNA**;
- 39) Centrifugar a fração positiva (CD19⁺) por 5 min a 2500 rpm;
- 40) Aspirar sobrenadante e ressuspender *pellet* em 1mL de solução de enxágue MACS;
- 41) Adicionar 20µL do reagente de liberação MultiSort para cada mL de células;
- 42) Incubar por 10 min entre 4 e 8°C (em gelo molhado ou geladeira);
- 43) Passar amostra numa coluna LS nova para remover células ainda marcadas com as *beads* e recuperar efluente;
- 44) Centrifugar efluente por 5 min a 2500 rpm;
- 45) Aspirar sobrenadante e ressuspender *pellet* em 1mL de **tampão acetato de sódio, pH 3,5**, para remover receptor Fc ligado a IgG;
- 46) Incubar a temperatura ambiente por 3 min;
- 47) Lavar com 1mL de solução de enxágue MACS;
- 48) Centrifugar por 5 min a 2500 rpm;
- 49) Aspirar sobrenadante e lavar novamente com 1mL de solução de enxágue MACS;
- 50) Centrifugar por 5 min a 2500 rpm;
- 51) Aspirar sobrenadante e ressuspender *pellet* em 50µL de solução de enxágue MACS;
- 52) Adicionar 30µL do reagente de parada MultiSort para cada 10⁷ células;
- 53) Homogeneizar bem;
- 54) Adicionar 20µL de *beads* magnéticos Anti-IgG humana para cada 10⁷ células;
- 55) Homogeneizar bem;
- 56) Incubar por 15 min entre 4 e 8°C (em gelo molhado ou geladeira);
- 57) Lavar com 1 a 2mL de solução de enxágue MACS para cada 10⁷ células;
- 58) Centrifugar por 5 min a 2500 rpm;
- 59) Aspirar sobrenadante e ressuspender até 2 x 10⁸ células em 1mL de solução de enxágue MACS;

Obs.: cuidar para não formar bolhas, pois esta solução será usada na coluna. Se houver grumos de células, retirá-los. A capacidade das colunas LS é de até 2 x 10⁹ células totais e de até 10⁸ células positivas.

- 60) Posicionar a coluna no magneto;
- 61) Hidratar a coluna com 3mL de solução de enxágue MACS;
- 62) Assim que parar de gotejar, aplicar a amostra na coluna;

- 63) Quando a amostra terminar de passar, lavar 5 vezes com 3mL de solução de enxágue MACS, sempre esperando parar de gotejar para iniciar nova lavagem;
- 64) Para melhorar pureza, retirar cuidadosamente última gota fazendo uso do êmbolo;
- 65) Retirar a coluna do magneto e adicionar 5mL de solução de enxágue MACS;
- 66) Colocar o êmbolo e empurrar para retirar as células retidas na coluna, que são as células de interesse;

Obs.: antes de empurrar o êmbolo, deixar escorrer cerca de 1mL para que as células se soltem um pouco da coluna, diminuindo o estresse mecânico que poderia ativá-las.

- 67) Retirar o êmbolo, colocar mais 2mL de solução de enxágue MACS e empurrar novamente;
- 68) Retirar uma alíquota de 50µL para a **contagem** (fator de diluição: 7 mL) e 100 mil células B CD19⁺IgG de memória para **verificação de pureza da separação**;
- 69) Reservar as frações positiva (CD19⁺IgG de memória) e negativa (CD19⁺IgG⁻) para posterior lise (homogeneização para extração de RNA).

PROTOCOLO SEPARAÇÃO CELULAR MONÓCITOS

Obtenção de PBMC:

- 1) Transferir o sangue para um tubo falcon; 2) Adicionar 2 a 4 vezes de PBS 1X ao volume de sangue (para 10mL de sangue, 30mL de PBS 1X); (sangue e reagentes a temperatura ambiente)
- 3) Homogeneizar bem;
- 4) Adicionar a solução de sangue + PBS lentamente e com muito cuidado sobre a solução de Ficoll aliqtotada em tubo falcon (para cada 40ml de solução, 10mL de Ficoll);
- 5) Centrifugar por 30 min a **2500 rpm** (corresponde aproximadamente a 400 xg);

Obs.: centrifugação a temperatura ambiente e com freios desligados.

- 6) Retirar a fase correspondente ao plasma diluído a partir da superfície, parando cerca de 0,5 cm antes do anel de PBMC;
- 7) Retirar a fase com plasma diluído (0,5cm) + anel de PBMC com cuidado para não pegar hemácias, transferindo a fase para um tubo falcon novo de 15mL;
- 8) Lavar com **solução de enxágue MACS**, completando até 15mL e homogeneizar bem;
- 9) Centrifugar por 10 min a 1400 rpm (corresponde aproximadamente a 200 xg) para remoção de plaquetas;

Obs.: a partir daqui, refrigerar centrífuga entre 4 e 8°C e religar freios;

- 10) Aspirar sobrenadante (verter) e ressuspender *pellet* em volume pequeno de PBS 1X;(5ml)
- 11) Ressuspender em 15mL de PBS 1X e retirar uma alíquota para **contagem** (50µL), uma para **verificação de viabilidade** (100µL) e 300 mil células para **verificação de pureza no citômetro**;
- 12) Completar logo em seguida até 15mL para finalizar 2ª lavagem;
- 13) Centrifugar por 10 min a 1700 rpm (corresponde aproximadamente a 300 xg);
- 14) Aspirar sobrenadante (verter) e retirar o que restar com auxílio de micropipeta com cuidado para não aspirar células;

Separação Celular com *Beads* Magnéticos:

- 1) Ressuspender *pellet* em 80µL de **solução de enxágue MACS** para cada 10⁷ células em tubo falcon de 14mL;

- 2) Adicionar 20 μ L de beads magnéticos CD14 MicroBeads para cada 10⁷ células;(homogeneizar tubo de beads)
- 3) Homogeneizar bem;
- 4) Incubar por 15 min entre 4 e 8°C (em gelo molhado ou geladeira);
- 8) Lavar com 1 a 2mL de solução de enxágue MACS para cada 10⁷ células;
- 9) Centrifugar por 5 min a **3500** rpm;
- 10) Aspirar sobrenadante e ressuspender até 2 x 10⁸ células em 1mL de solução de enxágue MACS;

Obs.: cuidar para não formar bolhas, pois esta solução será usada na coluna. Se houver grumos de células, retirá-los. A capacidade das colunas LS é de até 2 x 10⁹ células totais e de até 10⁸ células positivas.

- 11) Posicionar a coluna no magneto;
- 12) Hidratar a coluna com 3mL de solução de enxágue MACS;
- 13) Assim que parar de gotejar, aplicar a amostra na coluna;
- 14) Quando a amostra terminar de passar, lavar 5 vezes com 3mL de solução de enxágue MACS, sempre esperando parar de gotejar para iniciar nova lavagem;
- 15) Para melhorar pureza, retirar cuidadosamente última gota fazendo uso do êmbolo;
- 16) Retirar a coluna do magneto e adicionar 5mL de solução de enxágue MACS;
- 17) Colocar o êmbolo e empurrar para retirar as células retidas na coluna, que são as células de interesse;

Obs.: antes de empurrar o êmbolo, deixar escorrer cerca de 1mL para que as células se soltem um pouco da coluna, diminuindo o estresse mecânico que poderia ativá-las.

- 18) Retirar o êmbolo, colocar mais 2mL de solução de enxágue MACS e empurrar novamente;
- 19) Retirar uma alíquota de 50 μ L para a **contagem** (fator de diluição: 7 mL) e 200 mil células CD4⁺ para **verificação de pureza da separação**;
- 20) Descartar a fração negativa (CD14⁻);
- 21) Reservar a fração positiva (CD14⁺) para posterior lise (homogeneização para extração de RNA).